
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

L'ÉVOLUTION DES SPOROZOAIRES DU GENRE COCCIDIUM

PAR LE D^r P.-L. SIMOND

Médecin de 1^{re} classe des Colonies.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Évolution du *Coccidium oviforme*.

§ 1^{er}. HISTORIQUE. — Le plus anciennement connu des *Coccidium* est celui qui fut découvert dans le foie du lapin par Hake en 1839; Leuckhart lui appliqua le premier le nom de *coccidie*, et appela *Coccidium oviforme* l'espèce rencontrée chez le lapin. Balbiani, étudiant l'évolution intracellulaire et le développement exogène du parasite, montra que chacune des quatre spores renfermées dans le kyste contient deux germes ou *sporozoïtes*. Il semblait que l'histoire du *Coccidium oviforme* fût dès lors complète, et que les caractères de sa reproduction par un kyste sporulé exogène suffisaient à marquer définitivement sa place dans la classification. Cependant un point demeurait inexpliqué, la disproportion apparente entre le nombre de kystes formés dans les cellules épithéliales et celui des germes ingérés par l'animal porteur de parasites. Cette remarque, faite depuis longtemps en dehors de toute expérience, n'a pas reçu d'explication satisfaisante avant les travaux de R. Pfeiffer et de Podwissotzky.

En 1892, R. Pfeiffer (19) rencontra, dans le foie et l'intestin

des animaux malades, des formes de reproduction particulières consistant dans la division du plasma de la coccidie en corps falciformes au sein même de la cellule hôte, sans intermédiaire de kyste ni de spores, par le processus antérieurement connu chez les *Eimeria* et *Karyophagus*, qu'il était censé caractériser. R. Pfeiffer fonda sur cette découverte la théorie du dimorphisme, d'après laquelle le *Coccidium* du lapin possède deux cycles évolutifs, l'un endogène asporulé, qui détermine la pullulation dans les tissus de l'hôte, l'autre exogène sporulé, qui permet la contagion aux autres animaux et assure la conservation de l'espèce. F. Le Dantec (14) compare ces deux modes de reproduction aux deux sortes de spores du *Puccinia graminis*.

Podwissotzky (20), reprenant l'étude du développement du *Coccidium oviforme* dans les canaux biliaires, a retrouvé les formes endogènes décrites par R. Pfeiffer, et signalé en outre des stades, qu'il considère comme des formes à microsporozoïtes, où les germes sont en très grand nombre, avec un volume ne dépassant pas celui d'une bactérie ordinaire.

La théorie du dimorphisme paraissait résoudre d'une façon satisfaisante le problème de la multiplication du parasite dans l'organisme de son hôte et de la longue durée de la maladie. Aussi L. Pfeiffer a-t-il émis l'hypothèse que ce double cycle devait être général dans tout le groupe des COCCIDIES. Tous les naturalistes n'ont pas accepté cette manière de voir, et, parmi les spécialistes de la question, Aimé Schneider (23) et Labbé (12) se sont élevés très vivement contre la théorie de R. Pfeiffer. A. Schneider a opposé divers arguments, sans indiquer quel mécanisme pourrait expliquer, en dehors de cette théorie, la pullulation des coccidies dans les tissus. Labbé nie le dimorphisme de R. Pfeiffer, tout en admettant, dans certains cas d'infection suraiguë, un processus de multiplication très différent, qui consisterait en une ou deux bipartitions successives de la coccidie dans la cellule où elle évolue.

Le reproche le plus grave adressé à la théorie du dimorphisme est de reposer seulement sur cette observation qu'il y a coexistence chez le lapin de deux formes de reproduction, lesquelles pourraient aussi bien appartenir à des parasites différents, ainsi que Labbé dit l'avoir constaté chez les oiseaux.

Il nous a paru intéressant d'essayer de résoudre cette question

controversée du dimorphisme évolutif des *Coccidium*, dont l'importance dépasse celle d'un litige concernant un point théorique d'histoire naturelle, puisque nombre d'épizooties et diverses maladies humaines relèvent de parasites appartenant au même groupe ou à un groupe voisin de SPOROZOAIRES. Au cours de nos recherches, qui ont porté plus spécialement sur le *Coccidium oviforme*, le *Karyophagus salamandræ* et le *Coccidium proprium*, nous avons observé des faits nouveaux qui nous ont permis de ramener au genre *Coccidium* le parasite de la salamandre, et d'établir sur des bases plus solides la parenté, affirmée par Metchnikoff, en 1887 (46), entre le microbe du paludisme et le groupe des coccidies.

§ II. EXPÉRIENCES DÉMONTRANT LE DIMORPHISME ÉVOLUTIF DU COCCIDIUM OVIFORME. — On sait que l'infection du lapin a lieu par ingestion de kystes sporulés du *Coccidium oviforme*¹, mélangés à sa nourriture : ces kystes et leurs spores s'ouvrent dans le tube digestif, et l'on admet que chacun des sporozoïtes, mis en liberté, pénètre, par un processus encore inconnu, dans une cellule épithéliale pour y accomplir son évolution.

Chacun des kystes ingérés, contenant huit sporozoïtes, doit donner naissance à huit coccidies. Il était nécessaire de vérifier tout d'abord et d'établir scientifiquement le bien fondé de l'opinion d'après laquelle il y a disproportion entre le nombre des kystes ingérés et celui des kystes de nouvelle formation. A cet effet, nous avons isolé un jeune lapin, après nous être assuré qu'il était indemne de coccidiose, et nous lui avons fait ingérer un nombre de kystes mûrs qu'un calcul approximatif a permis d'évaluer au chiffre de 3,500. Pendant toute la durée de l'expérience, l'animal a reçu une nourriture stérilisée afin d'écarter toute chance d'infection étrangère. Au 8^e jour après l'ingestion des coccidies, les déjections contenaient des kystes en quantité énorme : en diluant dans 4 c. c. d'eau distillée, 1 gramme de déjections, et faisant ensuite sous le microscope la numération des kystes contenus en moyenne dans une goutte de cette émulsion, nous avons calculé qu'il existait plus d'un millier de coccidies par centigramme de déjection ; c'est dire qu'on peut compter par millions les kystes émis en un jour par le petit

1. Nous désignons sous ce nom aussi bien le *C. oviforme* que le *C. perforans* des auteurs.

lapin, proportion qui s'est maintenue jusqu'à la mort, survenue quelques jours après. Il résulte de cette expérience qu'il se produit effectivement dans l'organisme du lapin malade une multiplication des coccidies, et qu'on ne saurait imputer à des réinfections journalières la quantité de kystes émis ainsi que la persistance fort longue de leur formation. Les chiffres que nous avons obtenus montrent en outre l'insuffisance de la bipartition, même deux fois répétée, pour expliquer le phénomène; c'est en effet à des centaines de milliers qu'on doit estimer la quantité de kystes provenant de chaque coccidie ingérée. Labbé (11) avait primitivement admis ce mode de multiplication seulement pour les cas d'infection aiguë et rapidement mortelle¹; or il est facile de montrer que la multiplication se produit dans les cas de coccidiose chronique auxquels les animaux résistent. Si l'on isole un lapin adulte bien portant, quoique atteint de coccidiose, ce qui est le cas ordinaire, et qu'on le maintienne dans des conditions telles qu'il ne puisse subir d'infection nouvelle, on constate que la production de kystes dure plusieurs mois, au cours desquels l'animal en expulse des millions. Nous avons vérifié que l'éclosion des coccidies sporulées ingérées par l'animal a lieu en moins de cinq jours, et que l'évolution intracellulaire du parasite pour atteindre le stade enkysté ne dépasse pas dix jours; par suite, les kystes émis au bout d'un mois d'isolement ne peuvent procéder par génération directe de ceux, quel que fût leur nombre, ingérés avant le début de l'expérience. Il y a eu multiplication certaine du parasite dans les tissus.

Ce premier point acquis, nous avons fait, en vue de démontrer le dimorphisme du *Coccidium oviforme*, l'expérience suivante.

Une lapine pleine, indemne de coccidiose, comme nous nous en sommes assuré par l'examen préalable des déjections, a été isolée et a mis bas cinq petits. Onze jours après leur naissance, ces jeunes lapins ont été séparés de leur mère, placés isolément dans des récipients stériles au laboratoire, et nourris avec du lait stérilisé. L'un d'eux a absorbé, mélangés au lait, des kystes mûrs de *Coccidium oviforme* en grande quantité, et pendant trois jours consécutifs, afin de déterminer une infection intense.

1. Dans un travail récent (12), le même auteur élargit cette manière de voir et affirme que la bipartition peut s'opérer un grand nombre de fois successivement. Cette conception de la multiplication du parasite est en désaccord avec nos observations.

Au bout de huit jours, cet animal devient malade et ses déjections renferment des kystes nombreux de *Coccidium*. Son état va s'aggravant, avec les symptômes ordinaires de la coccidiose mortelle. Le onzième jour, il présente un flux diarrhéique où pullulent les coccidies, il éprouve des convulsions et, comme il est moribond, nous le sacrifions.

Aucun des quatre lapins témoins ne montra de symptômes semblables ; l'un fut sacrifié le huitième jour, un autre le neuvième, un autre le dixième et enfin le dernier le douzième jour. Leurs déjections, journellement examinées, n'avaient à aucun moment contenu des kystes ; l'autopsie ne montra chez aucun d'eux, ni dans l'épithélium intestinal, ni dans celui des canaux biliaires, la présence ni de formes endogènes ni de formes enkystées de coccidies.

L'autopsie du petit lapin infecté, pratiquée immédiatement après la mort, révéla une coccidiose intense limitée à l'intestin ; les plaques déterminées par la pullulation des parasites se présentaient confluentes, surtout dans le premier tiers de l'intestin grêle.

L'examen, à l'état frais, de cette portion du tube digestif montre les cellules épithéliales contenant des coccidies à tous les degrés de développement. La plupart sont en voie d'accroissement et constituent une sphère granuleuse pourvue d'un gros noyau central réfringent ; elles ont la coloration verdâtre commune chez les coccidies. Un grand nombre de parasites sont près de s'enkyster, comme l'indiquent leur volume et leur forme ovale, ou sont déjà enkystés. Beaucoup moins abondantes que les précédentes, se rencontrent des formes de reproduction asporulée, identiques la plupart à celles décrites par R. Pfeiffer (19) et pour lesquelles Labbé a créé le genre *Pfeifferia* ¹.

Si l'on considère ces formes, arrivées à leur parfait développement dans la cellule hôte, on voit qu'elles ont un volume assez variable, souvent inférieur à celui d'un kyste, et qu'elles sont constituées par un amas de germes ou corps falciformes. La cellule hôte, vide de son contenu, forme à cet amas *dépourvu de membrane propre* une coque qui lui sert d'enveloppe protectrice.

À l'ordinaire, l'amas comprend une vingtaine de corps falciformes ; toutefois nous en avons observé qui renfermaient jusqu'à

1. LABBÉ, *C. R. Ac. sc. Paris*, tome 419, 1894, p. 537-539.

cinquante germes et plus. Tantôt ceux-ci sont rangés symétriquement par rapport à l'axe de la coccidie, qui représente alors assez bien une orange pelée; tantôt, surtout s'ils sont très nombreux, ils sont disposés sans ordre apparent. Chaque corps falciforme constitue un vermicule nucléé qui, dans les formes en orange pelée, atteint la longueur de leur diamètre et se courbe en arc, tandis qu'il se montre plus court et presque rectiligne dans les formes qui en renferment un grand nombre. Souvent on rencontre ces corps de reproduction asporulée à des stades moins avancés, qui montrent la coccidie segmentée en un nombre variable de petites sphères claires, pourvues chacune d'un noyau réfringent, et dont chacune va devenir un corps falciforme.

A côté des formes que nous venons de décrire, il en est d'autres appartenant aussi au cycle asporulé (Pl. xvii, fig. 11-14), difficiles à reconnaître à l'état frais si l'on n'est pas prévenu. Ce sont des corps volumineux, généralement plus grands que toutes les autres formes du parasite, nus comme les précédents à l'intérieur d'une cellule hôte, constitués par une masse non granuleuse de protoplasma dépourvue de noyau central, et qui présente à sa surface une infinité de grains réfringents plus ou moins allongés en bâtonnets.

Nous devons revenir sur ces diverses formes intracellulaires en décrivant la double évolution du *Coccidium oviforme* telle qu'elle ressort de l'étude des coupes pratiquées sur l'intestin des jeunes lapins infectés expérimentalement. Pour obtenir les préparations qui ont servi à cette étude, nous avons employé la double coloration à la safranine et au picro-indigo-carmin. Cette méthode, qui a servi à Podwissotzky pour l'étude de la coccidiose du foie des lapins, donne des préparations d'une grande netteté avec des différenciations très délicates. Nos pièces étaient fixées avec le liquide de Flemming, solution forte.

Les plus jeunes formes de coccidies rencontrées dans les cellules épithéliales constituent une petite sphère protoplasmique dépourvue de membrane, d'aspect hyalin, plus claire près du centre, où l'on voit un gros globule chromatique qui constitue le nucléole (Karyosome des auteurs; Pl. xvii, fig. 1). Un peu plus tard, l'aire claire centrale s'accuse et se limite davantage, de manière à représenter un véritable noyau qui demeurera incolore à l'exception de son nucléole. Très souvent, dès les pre-

miers stades, on observe, à côté du nucléole sphérique, un second corps chromatique, qui se distingue par une forme en croissant dont la concavité embrasse le nucléole sphérique (Pl. xvii, fig. 2). Au lieu de l'apparition du croissant chromatique, on peut, vers cette même période de début, observer la division du nucléole; en ce cas, on voit dans l'aire nucléaire deux nucléoles semblables et égaux, d'abord rapprochés et unis par des filaments chromatiques qui, plus tard, s'individualisent et ne tardent pas eux-mêmes à subir une division nouvelle (Pl. xvii, fig. 9 et 10). Ces deux stades de début, apparition d'un nucléole en croissant d'une part, division du noyau d'autre part, marquent l'origine des deux modes différents d'évolution de la coccidie, dont le premier aboutira à la reproduction par le kyste exogène sporulé, l'autre à la reproduction endogène intracellulaire sans intermédiaire de spores, par division directe du parasite en un certain nombre de germes. On peut suivre dans les préparations l'un et l'autre développement, et retrouver la succession ininterrompue des stades propres à chacun.

Il règne, jusqu'à présent, une certaine confusion dans les termes employés pour distinguer la reproduction par les spores anciennement connues, qui ont fait donner au groupe le nom de Sporozoaires, de celle par division directe d'une coccidie à l'intérieur de la cellule hôte. Afin d'apporter plus de clarté dans notre exposition, nous adoptons provisoirement pour cette dernière le nom de reproduction *asporulée*, par opposition à celle qui a lieu au moyen d'une spore résistante, et à laquelle nous conservons le qualificatif de *sporulée*. Dans le même but, nous appellerons MÉROZOÏTE le germe issu de la division directe d'une forme de reproduction asporulée, par opposition au SPOROZOÏTE, terme qui nous servira à désigner le germe provenant d'une spore. Nous le répétons, nous n'avons en vue ici que la clarté du discours, et nous pensons qu'il y a lieu d'attendre que l'histoire des coccidies soit mieux fixée pour reviser définitivement et la terminologie et la classification.

§ III. CYCLE SPORULÉ. — En règle générale, la présence du nucléole secondaire en croissant dans le noyau d'une jeune coccidie caractérise le début du cycle sporulé. En même temps que lui, apparaissent parfois dans l'aire nucléaire quelques minuscules grains chromatiques qui peuvent se retrouver à divers moments

de l'évolution coccidienne. Quant au nucléole en croissant, il persiste pendant la première période de cette évolution et disparaît, en général, bien avant que le parasite ait atteint son complet développement. Le processus de cette disparition paraît consister en une fusion de ce corps avec le nucléole sphérique. (Pl. xvii, fig. 2-4). Nous examinerons plus loin quelle interprétation il convient de donner à ce phénomène.

Au stade qui suit l'apparition du croissant, on commence à rencontrer des granules chromatiques dispersés dans tout le cytoplasma, d'abord en petit nombre, bientôt plus abondants, avec une tendance à gagner la zone périphérique. Au fur et à mesure que la coccidie grandit, ces grains, non seulement augmentent en nombre, mais aussi leur volume s'accroît; ils se nourrissent aux dépens du plasma qui les environne jusqu'à acquérir un volume égal, ou même supérieur, à celui du nucléole sphérique central (Pl. xvii, fig. 4 et 5).

Quand la coccidie est près d'atteindre ou a atteint son maximum de volume, elle apparaît comme une sphère bourrée de granules chromatiques régulièrement arrondis, de plus en plus serrés et volumineux à mesure qu'on les considère plus rapprochés de la périphérie. Cette abondance de granulations peut empêcher parfois de distinguer le noyau. On rencontre, mais exceptionnellement, une disposition particulière des granules chromatiques à ce stade; ils sont groupés en amas distincts disposés d'une façon à peu près symétrique par rapport au noyau.

Dans les préparations fixées et colorées par le procédé que nous avons indiqué, les granules plastiques non chromatiques ne paraissent pas. Il faut, pour les mettre en évidence, employer d'autres colorations; on voit alors qu'ils remplissent les interstices existant entre les granules plastiques; par suite, la masse protoplasmique qui entoure le noyau se montre entièrement constituée par des granulations.

A partir du stade où elle commence à former des granulations chromatiques, la coccidie a son noyau bien délimité, pourvu d'une membrane délicate. Le nucléole sphérique en occupe le centre, ayant, pendant un certain temps, à côté et très rapproché de lui, le corps chromatique en croissant.

Lorsque le parasite a acquis tout son développement, il se

produit d'une façon régulière un arrangement très remarquable des granules chromatiques, arrangement non sans rapport avec la formation des membranes d'enveloppe qui vont constituer à la coccidie une paroi kystique. Jusqu'à présent, ces granules étaient dispersés dans tout le cytoplasma, se montrant toutefois progressivement plus abondants et plus gros à mesure qu'ils étaient plus proches de la périphérie. Au stade qui précède immédiatement l'enkystement, cette disposition se modifie : les granulations se tassent vers la périphérie en une, deux ou trois rangées régulières, très serrées, dont la ou les deux plus externes comprennent exclusivement les gros granules chromatiques. Par suite de ce tassement, une grande aire claire apparaît autour du noyau (Pl. xvii, fig. 5) dans laquelle se voient seulement les plus petits grains safranophiles. En poussant plus ou moins loin la décoloration, on constate que les granules chromatiques sont plus ou moins fortement safranophiles, et que tous, ou presque tous ceux d'une même rangée, manifestent au même degré leur pouvoir de fixation vis-à-vis de la safranine.

Ce stade d'arrangement des granules chromatiques en couches périphériques régulières suit de près la disparition du nucléole satellite en croissant; quelquefois il coïncide avec elle; rarement ce corps persiste jusqu'à l'enkystement. La coccidie prend aussitôt après la forme ovoïde qui va caractériser sa phase kystique; il est exceptionnel qu'elle conserve la forme sphérique pour s'enkyster. Le premier indice de la formation des membranes consiste dans le resserrement en divers points des granulations chromatiques de la rangée la plus externe; on les voit s'accoler les unes aux autres par petits groupes, et perdre ensuite leur forme sphérique pour s'aplatir comme par écrasement vers leur pôle externe (Pl. xvii, fig. 7).

Un peu plus tard, une membrane est visible et montre pendant un certain temps, appliquées à sa face interne, des plaques irrégulières, disséminées, de substance chromatique paraissant provenir des granules chromatiques déformés; on observe le même phénomène pendant la formation de la deuxième membrane. Enfin, ce processus achevé, on distingue une paroi formée de deux membranes fortement chromatiques qui fixent la safranine. A l'intérieur du kyste, les granulations ont généralement diminué de nombre et de volume, et ont perdu en partie leur affinité

pour la safranine. Le noyau renferme toujours son nucléole sphérique qui semble parfois moins volumineux qu'avant l'enkystement. Au bout de peu de temps, la paroi cesse d'être colorable par la safranine; on voit alors l'aire nucléaire s'infiltrer de graisse, et des granules graisseux apparaître dans le protoplasma (Pl. xvii, fig. 8). Le processus semble indiquer le début de la contraction de la masse granuleuse qui se transforme en une sphère, de volume égal à la moitié environ de celui du kyste tout entier, baignée dans un liquide transparent. A ce stade, le globe granuleux qui montre à l'état frais ses granules tassés autour du noyau est infiltré de graisse, de telle sorte qu'après fixation par un liquide contenant de l'acide osmique, il apparaît le plus souvent comme une masse noire dont on ne peut distinguer les éléments. C'est ce stade qui représente l'état parfait du kyste, état qu'il doit acquérir dans le corps de l'hôte pour pouvoir, une fois évacué, mûrir dans le milieu extérieur. La phase de l'évolution du *Coccidium oviforme* en kyste qui aboutit à la sporulation, avec ou sans reliquat de segmentation, est trop bien connue pour que nous ayons à nous en occuper. Le kyste dont nous venons d'indiquer la formation présente souvent une sorte d'amincissement de la membrane à l'un des pôles, qui donne l'illusion d'un micropyle. Nous avons pu nous convaincre que cette apparence résulte d'une ouverture réelle existant au pôle de la membrane externe et contre laquelle s'applique en la bouchant la membrane interne dépourvue de tout orifice (Pl. xvii, fig. 18). C'est là un point faible de la paroi kystique, dont le rôle paraît être de faciliter la sortie des spores.

§ IV. CYCLE ASPORULÉ. — L'évolution qui aboutit à la reproduction asporulée se caractérise le plus souvent de très bonne heure par la division du nucléole primitif en deux nucléoles égaux, et semblables de formes, qui se divisent à leur tour de telle façon que, dès les stades rapprochés du début, on ne retrouve ni noyau ni nucléole centraux, mais seulement un nombre peu considérable de granules chromatiques sphériques, qui sont les nucléoles provenant de la division du noyau primitif, dispersés dans le plasma. Cette division du noyau primitif et des noyaux qui en dérivent peut se continuer plus ou moins longtemps, et fournir un nombre de noyaux définitifs extrêmement variable. D'ordinaire ce

nombre, assez restreint, est compris entre 20 et 50, ou même réduit à 8 ou 10. Dans d'autres cas la division est poussée si loin que les nucléoles formés apparaissent dans le plasma comme une poussière de grains chromatiques. Le stade auquel aboutit cette extrême multiplication diffère d'une façon profonde, comme nous le verrons plus loin, de celui qui comporte un nombre limité de noyaux de nouvelle formation.

L'une des raisons de l'inégalité du pouvoir de multiplication dévolu au noyau chez les différents individus est probablement en rapport avec les conditions de nutrition de la coccidie : on observe en effet une relation constante, sinon très précise, entre le volume qu'elle atteint et le nombre de divisions fournies par son noyau. Nous admettons qu'il existe d'autres raisons plus énergiques se rattachant aux qualités propres du noyau, et peut-être au nombre de générations asporulées qui ont précédé celle que l'on considère. Quoi qu'il en soit, le fait que la division peut s'arrêter à divers stades est important, parce qu'il détermine le nombre de germes que comprendra le corps reproducteur asporulé.

A. — Dans le cas de la production d'un nombre restreint de noyaux secondaires (8 à 50), aussitôt la division arrêtée, chacun d'eux devient un centre d'attraction du protoplasma, qui se divise, ainsi sollicité, en autant de petites masses qu'il y a de noyaux dans la cellule coccidienne. Chaque petite masse se dispose en une sphérule dont un nucléole occupe le centre (Pl. xvii, fig. 13); bientôt elle s'allonge en ovoïde, puis ses extrémités s'effilent, et le *mérozoïte* est constitué. Ce mérozoïte représente un vermicule fusiforme, courbé en arc le plus souvent, et pourvu d'un petit noyau rond, central, déjà visible à l'état frais. Le nucléole de ce noyau apparaît, dans les préparations fixées, constitué par un certain nombre de minuscules grains de chromatine disposés à peu près circulairement.

Nous n'avons fait aucune recherche sur la constitution et la division du noyau des *Coccidium* et nos procédés de fixation ne nous ont pas permis de distinguer les figures achromatiques de la karyokinèse. Nous l'admettons par analogie avec ce qui se passe chez d'autres sporozoaires, le *Monocystis* par exemple, où elle a été démontrée par Henneguy (8).

B. — Des coccidies, dans lesquelles le noyau primitif s'est

divisé d'une manière presque indéfinie, aboutissent à un stade différent de celui que nous venons d'étudier. En ce cas, l'accroissement du parasite continue jusqu'à ce que son volume ait dépassé celui des formes asporulées ordinaires et des formes enkystées; les nucléoles, très nombreux et d'un volume n'excédant pas celui d'un coccus, se présentent avec une forme sphérique répandus dans le cytoplasma (Pl. xvii, fig. 15). Au moment où cesse leur division, ils se portent à la périphérie de la coccidie, et commencent à subir un allongement qui les fait ressembler d'abord à des fuseaux, puis à des bâtonnets (fig. 16) et enfin à des cils, effilés à leur extrémité libre, et obtus à l'autre, qui adhère à la masse protoplasmique (fig. 17). Celle-ci leur fournit une petite quantité de protoplasma qui leur forme une gaine mince. A la fin du processus, le parasite représente une masse centrale entourée d'une véritable chevelure dont chaque élément, mesurant 5 à 9 μ , ressemble à un petit mérozoïte pourvu d'un noyau très allongé et proportionnellement très volumineux. Nous discuterons plus loin la signification de ce stade remarquable. (Voir page 568.)

Quel que soit, de ces deux termes, celui auquel doit aboutir le cycle asporulé, on n'observe pas, pendant son évolution, la production abondante de granules chromatiques qui caractérise l'évolution du cycle enkysté. Ce serait une nouvelle raison d'admettre que ces granules, ainsi que nous avons cru le reconnaître, jouent un rôle important dans la formation du kyste.

Existe-t-il d'autres modes de division de la coccidie dans le cycle asporulé? Nous ne saurions l'affirmer. Souvent nous avons rencontré des images de parasites dans une même cellule qui pourraient provenir de la bipartition affirmée par Labbé, mais il nous a été impossible de retrouver les stades où cette bipartition s'accomplirait. Dans bien des cas, chez le lapin atteint d'infection intense, on voit nettement plusieurs coccidies jeunes dans une même cellule, où chacune a pénétré individuellement; si l'on rencontre dans une autre cellule des coccidies plus âgées, accolées les unes aux autres, on n'est pas en droit de croire qu'elles proviennent d'une bipartition, plutôt que de la pénétration individuelle à l'état jeune. Le fait d'une bipartition unique paraît nécessaire pour expliquer les coccidies géminées, et Balbiani l'a soutenu pour certains cas particuliers; il n'a rien de surprenant

chez des êtres doués d'une si prodigieuse plasticité. Quant à la bipartition indéfiniment répétée admise par Labbé, elle ne concorde pas avec l'observation. On devrait trouver communément en ce cas plus de deux coccidies dans une cellule et c'est au contraire l'exception, au moins chez les espèces que nous avons étudiées.

Notons, pour terminer ce qui a trait à la reproduction asporulée, combien la variété des moyens mis en œuvre dans ce cycle contraste avec la régularité et l'unité qui règnent dans le cycle sporulé.

§ V. DÉGÉNÉRESCENCE DE LA CELLULE HÔTE. — La cellule dont un *Coccidium* a fait son hôtellerie subit, dans tous les cas, une série de modifications qui amènent sa dégénérescence et sa destruction finale.

Dès la pénétration du sporozoïte, le noyau de la cellule se retire à la périphérie et ne tarde pas à présenter des signes d'altération. C'est d'abord sa forme qui se modifie, le bord le plus proche du parasite se creuse en arc, et cette disposition s'accroît progressivement. Bientôt le noyau représente un croissant qui va s'amincissant de plus en plus. On ne saurait mieux comparer cette déformation qu'aux phases de la lune en voie de décroissance. En même temps, il se produit des modifications importantes dans la substance nucléaire, le karyoplasma devient plus dense et plus fortement colorable, tandis que les nucléoles diminuent de volume, perdent leur colorabilité et finissent par disparaître. A la fin de l'évolution du parasite, le noyau n'est plus représenté que par une ligne arquée fortement colorable, avec quelques rares grains chromatiques.

Pendant que le noyau subit cette dégénérescence, le cytoplasma disparaît, et la caverne qu'il offre à la coccidie s'agrandit en raison directe de l'augmentation du volume de celle-ci. La cellule hôte tout entière se réduit peu à peu à une coque plus ou moins épaisse. Dans les préparations colorées, elle apparaît comme une bague dont le noyau forme le chaton, et dont l'épaisseur est en raison inverse du volume du parasite qu'elle circonscrit. Au terme de l'évolution intracellulaire de la coccidie, la cellule hôte n'est plus qu'une enveloppe mince, distendue et prête à se rompre.

Récemment, Labbé (12) a assimilé les phénomènes qui s'ac-

complissent dans la cellule où une coccidie élit domicile à ceux produits par une symbiose ; il appelle *cytosymbiose* le parasitisme intracellulaire des coccidies, et considère celles-ci comme jouant le rôle d'*organoïdes* vis-à-vis des cellules parasitées. Nous ne saurions adopter cette manière de voir. Le terme de *symbiose* a en zoologie une signification précise, il s'applique à des êtres qui tirent de mutuels bénéfices de leur association ; or, quelle que soit la coccidie envisagée, on constate que sa présence dans une cellule amène progressivement et fatalement la désorganisation et la mort de celle-ci. La vie intracellulaire d'un sporozoaire constitue un exemple typique de parasitisme.

II

Évolution du *Coccidium* (*Karyophagus*) *Salamandræ*.

§ I^{er}. RECHERCHE ET ÉVOLUTION D'UN CYCLE SPORULÉ. — Après avoir reconnu et démontré expérimentalement la réalité du dimorphisme évolutif en ce qui concerne le *Coccidium* *oriforme*, il y a lieu de se demander si cette théorie est applicable aux autres coccidies du même genre, et même à celles jusqu'à présent considérées comme formant des genres distincts plus ou moins éloignés.

Un certain nombre de naturalistes sont déjà entrés dans cette voie, et ont apporté des faits qui confirment l'idée du dimorphisme évolutif étendu à tout le groupe des coccidies. Mingazzini (18) a reconnu des formes asporulées chez le *Klossia octoplane* ; Schuberg (24) a décrit des kystes sporulés chez l'*Eimeria falci-formis*, dont on connaissait seulement la reproduction Asporulée. J. Clarke (2) a observé chez le *Klossia* de la limace grise un cycle asporulé. Tout récemment Léger (15) a reconnu le dimorphisme chez un certain nombre de coccidies des arthropodes, notamment des *Eimeria*. Bien que ces divers travaux ne s'appuient pas sur des preuves expérimentales, ils constituent un argument en faveur de la généralité du dimorphisme.

Nos recherches en ce sens ont eu pour objet une coccidie dont le classement a, jusqu'à ce jour, fort embarrassé les naturalistes, le *Karyophagus salamandræ*.

En 1888, Heidenhain découvrait, dans les noyaux des cellules de l'épithélium intestinal des salamandres, un parasite appartenant au groupe des coccidies, dont il fait une courte description.

Après lui Steinhaus (27) reprend l'étude du même parasite auquel il donne le nom de *Karyophagus salamandrae*¹, et insiste sur deux caractères intéressants de cette coccidie, l'habitat intranucléaire et la reproduction par des corps asporulés, endogènes, en forme de barillet ou d'orange pelée, comme ceux rencontrés plus tard chez le lapin par R. Pfeiffer (19). Avec ces auteurs, on a admis jusqu'à présent que cette forme de reproduction était la seule du *Karyophagus* et suffisait à assurer sa pérennité.

Quand on étudie ces corps reproducteurs ou mérozoïtes isolés, au point de vue de leur résistance hors de la cellule hôte, on voit qu'ils sont d'une grande fragilité. Il suffit de les abandonner pendant quelques heures à l'air ou dans l'eau, hors du corps de l'animal, pour amener leur mort. Même pour les rencontrer en bon état, soit dans les noyaux, soit libres dans l'intestin, il est indispensable de pratiquer l'autopsie très rapidement après avoir sacrifié la salamandre; peu d'heures après la mort, en effet, ils se résolvent en granulations d'apparence grasseuse et disparaissent. L'infection coccidienne atteint l'épithélium intestinal au voisinage de l'estomac, et s'arrête plus ou moins au-dessus du renflement terminal de l'intestin dans lequel s'accumulent les déjections; or les amas en barillets de mérozoïtes libres ou intranucléaires se rencontrent seulement dans la portion d'intestin malade, et n'arrivent pas jusqu'à la poche rectale; du moins, s'ils y arrivent exceptionnellement, ils y sont rapidement détruits par la putréfaction des excréments. Sur de nombreuses salamandres, nous avons pratiqué des examens répétés du contenu rectal, sans jamais y rencontrer ces formes asporulées ni des mérozoïtes libres. Au contraire, les barillets se retrouvaient constamment chez ces animaux dans les parties plus élevées du tube intestinal.

On chercherait donc vainement les corps à mérozoïtes ou des mérozoïtes libres dans les déjections expulsées par la salamandre. Cette constatation suffit à montrer tout d'abord la fausseté de

1. Une espèce nouvelle de *Karyophagus* a été trouvée par Labbé chez les grenouilles.

l'hypothèse, généralement reçue, qui fait de ces formes le moyen de dissémination du *Karyophagus*. Nous avons été conduit par cette observation à admettre chez cette espèce une forme de résistance analogue à celle des *Coccidium* et à la rechercher.

Parmi les nombreux corps sphériques vivants qu'on peut rencontrer dans le contenu intestinal des salamandres, dont un grand nombre représentent des spores de champignons, et dont certains appartiennent aux infusoires répandus dans le tube digestif, il en est un que des examens minutieux révèlent constant chez les animaux parasités par le *Karyophagus*. C'est un corps arrondi ou ovalaire, constitué par une enveloppe à double contour, renfermant un contenu granuleux qui remplit entièrement sa cavité (Pl. xvi, fig. 5). Au centre de la sphère existe un noyau volumineux, réfringent, que les granulations ne permettent pas toujours de distinguer avec les forts grossissements; il faut alors, pour le mettre en évidence, avoir recours à un objectif faible. Ce corps a généralement une coloration verdâtre, il présente des dimensions un peu différentes chez une même salamandre, et cette différence s'accroît d'un animal à un autre : chez certaines salamandres, son diamètre mesure de 18 à 25 μ , chez d'autres il varie entre 20 et 30 μ . L'épaisseur de sa paroi atteint 1 μ ou 1 μ 1/2¹.

C'est là la forme de résistance du *Karyophagus*, comme le montre l'étude de son évolution au dedans et au dehors de l'organisme².

Si l'on suit un de ces kystes placé dans l'eau en goutte suspendue, à la température ordinaire, on constate au bout de peu de temps, 24 ou 48 heures, que son contenu subit une rétraction aboutissant à la constitution d'une sphère granuleuse plus petite, tangente le plus souvent en un point de la paroi, et baignée par un liquide transparent. Cette sphère, au centre de laquelle persiste le noyau, ne possède pas de membrane, et, à son maximum de contraction, représente à peu près les 2/3 du volume du kyste. (Pl. xvi, fig. 6.) Vers le quatrième jour, on peut quelquefois lui

1. Dans le contenu intestinal, le kyste montre fréquemment des rugosités de sa surface que nous avons cru d'abord appartenir à sa paroi propre; ce ne sont en réalité que des débris de la cellule épithéliale à l'intérieur de laquelle il s'est formé.

2. Nous avons retrouvé cette forme enkystée, à côté de la forme asporulée, chez des *Salamandra maculata* provenant de Vienne (Autriche), de Berlin, de Stuttgart et de Bretagne.

distinguer une ligne de partage méridienne qui se creuse en un sillon de plus en plus accentué. A un moment donné, on voit que les deux moitiés, de forme à peu près hémisphérique, sont entièrement séparées et contiennent chacune un noyau (Pl. xvi, fig. 7); un processus semblable amène la division de chacun des hémisphères, de telle sorte qu'entre le cinquième et le septième jour on trouve le contenu du kyste transformé en quatre petites masses granuleuses nucléées qui sont les sporoblastes. (Pl. xvi, fig. 8). Les granulations, au cours de ces divers stades, ont manifesté une activité qui se traduit par des modifications faciles à observer. Assez grosses, arrondies et peu réfringentes quand elles remplissaient le kyste, elles ont acquis, au stade de rétraction, une réfringence plus grande et une forme moins régulière, jusqu'à simuler de petits cristaux; enfin, après la division, les petites sphères filles apparaissent formées de granules arrondis, fins, très serrés et peu réfringents.

Un peu plus tard, chacun de ces quatre sporoblastes acquiert une forme régulièrement sphérique ou ovale, et sécrète une enveloppe délicate, à l'intérieur de laquelle les granulations se résorbent bientôt en partie jusqu'à constituer un tiers seulement du contenu. Ce phénomène accompagne la division du noyau du sporoblaste et l'organisation de deux corpuscules réfringents, les germes ou sporozoïtes, à côté desquels persiste le petit amas de granules non utilisés qui est un reliquat de différenciation. Chaque sporozoïte représente un petit vermicule court, réfringent, dont une extrémité est obtuse et renflée, l'autre effilée; les deux sporozoïtes sont en général placés côte à côte dans le même sens et embrassent dans leur concavité le reliquat granuleux. A ce moment la spore est constituée et le kyste arrivé au terme de son développement exogène: ce stade est atteint en général du dixième au douzième jour. (Pl. xvi, fig. 9, 10, 11).

La durée de la conservation des kystes en milieu humide est fort longue: nous avons constaté qu'elle dépasse six mois; toutefois la spore est souvent mise en liberté avant ce terme, par rupture spontanée du kyste, dont la paroi se ramollit peu à peu, perd sa rigidité, et, de sphérique, passe à la forme grossièrement tétraédrique qui moule le groupement des quatre spores (Pl. xvi, fig. 10). Il est facile de se rendre compte que le kyste dont nous venons d'exposer l'évolution exogène est bien la forme sporulée

du *Karyophagus*, car on retrouve dans les noyaux épithéliaux de l'intestin des salamandres toute la série des stades qui aboutissent à cette forme, concurremment avec ceux dont le terme est un corps reproducteur asporulé⁴. Nous avons suivi cette double évolution du *Karyophagus* par des examens à l'état frais et sur des préparations fixées au liquide de Flemming et colorées à la safranine.

Au stade le plus jeune observé dans les noyaux, la coccidie se compose, comme le *Coccidium oviforme*, d'une sphère hyaline au centre de laquelle est un nucléole chromatique sphérique (Pl. xvi. fig. 2 et 12). Cette sphère grandit aux dépens de la substance du noyau hôte, et acquiert bientôt des granulations; son noyau, représenté au début par un simple granule chromatique, devient vésiculeux et comprend une aire non colorable limitée par une membrane, avec le nucléole chromatique sphérique au centre. Au lieu de demeurer unique, ce noyau peut se diviser, soit de bonne heure, soit à un stade un peu avancé. De même que chez le *Coccidium oviforme*, c'est là le processus le moins ordinaire, et qui aboutit aux stades de la reproduction asporulée. Dans la grande majorité des cas, l'accroissement continue sans division du noyau, et l'évolution marche alors vers l'enkystement. A un moment donné, la totalité ou à peu près du noyau de la cellule épithéliale a été consommée par le parasite: il ne reste plus de cet élément que la membrane distendue. Les stades jeunes montrent dans le cytoplasme des granules chromatiques de petite dimension, généralement peu abondants jusqu'à une période avancée du développement. En même temps, à côté d'eux, des granulations plastiques plus volumineuses apparaissent, qui ne fixent pas les colorants nucléaires; enfin des granules graisseux se montrent à peu près au milieu de l'évolution sporulée, et leur nombre augmente jusqu'après l'enkystement du parasite. Ils sont dans le kyste en abondance et d'un volume tel qu'ils peuvent gêner l'observation des autres éléments (Pl. xvi. fig. 13 et 14). Notons que la présence de ces granules graisseux, avant l'enkystement, n'est pas absolument constante. Arrivée à la période ultime du développement intranucléaire, la coccidie s'enkyste par sécrétion d'une double mem-

4. Ainsi que Drüner l'a signalé, l'évolution du *Karyophagus Salamandræ* ne s'accomplit pas toujours dans le noyau de la cellule épithéliale. Quelquefois la majorité des parasites se rencontrent entre le noyau et le plateau des cellules.

brane d'enveloppe qui lui fait une paroi solide : elle tombe ensuite dans la lumière de l'intestin après destruction de la cellule hôte. L'existence du cycle sporulé que nous venons de décrire nous oblige à supprimer le genre *Karyophagus* pour le faire rentrer dans le genre *Coccidium*.

§ II. CYCLE ASPORULÉ. — Les choses ne se passent pas ainsi quand le développement du *Coccidium salamandrae* suit le cycle asporulé (Pl. xvi. fig. 15 à 20, 21 à 29). Comme nous l'avons indiqué plus haut, il y a, dans ce cas, division le plus souvent précoce du noyau en deux noyaux filles qui subissent à leur tour la bipartition, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il existe dans le plasma 16 à 24 noyaux autour desquels ce plasma se distribue de manière à former autant de petits globules nucléés (Pl. xvi. fig. 18 et 24-25). Chaque globule s'allonge en un vermicule qui acquiert presque toujours la longueur du diamètre de la coccidie et prend une forme en croissant (fig. 19 et 26). Finalement, le parasite est transformé en un amas de mérozoïtes rangés symétriquement par rapport à l'axe comme les douves d'un barillet ou les tranches d'une orange (fig. 19 et 26). On voit en général à l'un des pôles de ce corps un petit reliquat de segmentation granuleux (fig. 19). Les auteurs sont d'accord pour refuser à cette forme asporulée du *Coccidium salamandrae* une membrane d'enveloppe. C'est en effet la membrane du noyau de la cellule hôte ou, comme pour le *Coccidium oviforme*, la membrane de cette cellule elle-même qui lui constitue une coque protectrice jusqu'après la formation des mérozoïtes qu'elle laisse échapper en se rompant¹. Lorsqu'on provoque cette rupture par pression, l'amas nu des corps falciformes est mis en liberté, et ne montre plus le reliquat demeuré attaché aux lambeaux de l'enveloppe. Nous nous expliquons par cette circonstance que Steinhaus ait nié l'existence de ce reliquat, dont l'importance d'ailleurs nous semble minime, et qui n'est peut-être pas d'une constance absolue.

Steinhaus a beaucoup insisté sur un phénomène de segmentation que présenteraient parfois simultanément les mérozoïtes, et qui aboutit à la formation de deux barillets accolés par une extrémité. Nous n'avons pu observer ce phénomène, probablement parce qu'il n'est commun que pendant une période

1. A ce point de vue, le *C. Salamandræ* se comporte comme les autres *Coccidium*, et il n'y a pas lieu d'établir une distinction tranchée entre les formes *Karyophagus*, *Eimeria* et *Pfeifferia*, comme le fait Labbé (10 et 42).

déterminée de la coccidiose. Il est à rapprocher de celui rencontré par J. Clarke, (2, pl. 31, fig. 6 c), chez les mérozoïtes de la forme de reproduction asporulée des *Klossia* de la limace grise. On doit, pensons-nous, le considérer comme une manifestation inconstante de cette remarquable plasticité des coccidies que révèle l'histoire de leur développement. Ce double barillet a sa place auprès des corps à micromérozoïtes dont nous allons donner plus loin la description. En général, le barillet apparaît composé de mérozoïtes immobiles; il n'en est cependant pas toujours ainsi. Nous avons vu quelquefois les mérozoïtes se séparer les uns des autres et présenter, outre la flexion, des mouvements nettement amiboïdes, raccourcissement, allongement, production d'étranglements et de renflements, enfin progression en avant ou en arrière sans changement de forme perceptible pendant qu'elles s'accomplissent. Ces mouvements cessent très vite après qu'on a sacrifié la salamandre. Nous inclinons à considérer ces corps à mérozoïtes mobiles, qui existent également chez les autres *Coccidium*, comme l'état de maturité parfaite du corps en barillet immobile, plutôt que comme une forme asporulée différente.

A côté de la forme asporulée classique en barillet, contenant 15 à 20 mérozoïtes ou moins, on observe, mais plus d'une manière constante, des corps renfermant un plus grand nombre de germes, et qu'on peut considérer comme des corps à micromérozoïtes. L'une de ces formes diffère des barillets par le nombre plus considérable de mérozoïtes, qui peut aller jusqu'à 50 environ: ceux-ci sont plus effilés que les mérozoïtes ordinaires, plus mobiles et nucléés comme eux. Nous les avons vus se mouvoir dans la cavité intranucléaire, et arriver à percer la membrane pour s'en échapper; leurs mouvements étaient limités, lents, et consistaient en une flexion en arc suivie de redressement (Pl. xvi. fig. 27 et 28). Aussi peu fréquemment, nous avons rencontré des corps assez volumineux composés de mérozoïtes courts, épais, disposés en rangées irrégulières, imbriqués de façon à remplir la cavité du noyau, mesurant seulement la moitié ou le tiers de la longueur ordinaire, nucléés et immobiles (fig. 21). Il n'est pas impossible que ces corps à micromérozoïtes trapus soient un stade de la forme précédente à mérozoïtes minces et mobiles. Le stade qui précède la segmentation en micromérozoïtes est une coccidie volumineuse, à granulations fines et serrées.

III

Stade pseudo-flagellé mobile de l'évolution des coccidies.

§ 1^{er}. STADE A PSEUDO-FLAGELLES CHEZ LE COCCIDIUM SALAMANDRE. — Il existe, dans le cycle asporulé du *Coccidium Salamandre*, une autre forme de division intracellulaire du parasite qui présente une importance morphologique de premier ordre, en raison de ses affinités avec un stade analogue observé chez d'autres sporozoaires et en particulier chez la coccidie du paludisme. Metchnikoff (17) observa le premier cette forme en 1890, et fut frappé de son analogie avec le « corps à flagelles » de Laveran et les *Polymitus* de Danilewsky. Nous l'avons recherchée d'après les indications de Metchnikoff, et il nous a fallu sacrifier un grand nombre de salamandres pour la retrouver, car elle n'est pas constante pendant la durée de l'infection, et paraît se présenter en abondance seulement à des périodes déterminées.

À l'état frais, ce corps attire l'attention par sa mobilité : on distingue dans le noyau d'une cellule épithéliale une coccidie dont la surface est agitée par un tourbillonnement des granulations qui rappelle une ébullition. Un examen attentif montre que le centre de ce corps est une grosse sphère transparente autour de laquelle se meuvent, l'entraînant parfois dans un mouvement de rotation, des corps vermiculaires en forme de flagelles, qui lui sont adhérents par une extrémité ; ces flagelles impriment le mouvement aux granulations du protoplasma ambiant et les font tourbillonner avec eux. Si l'on surprend la coccidie au début de ce stade mobile, les flagelles paraissent d'abord assez courts ; sous l'œil de l'observateur, ils s'allongent et finalement ils se détachent les uns après les autres de la sphère claire, la refoulent souvent à une extrémité de la cavité nucléaire, et continuent à se mouvoir activement. Quand la membrane du noyau ou de la cellule hôte qui leur forme une enveloppe se rompt, leur mouvement persiste au dehors. Dans l'humeur aqueuse, qui constitue un milieu de choix pour l'examen à l'état

frais des coccidies, nous avons vu le mouvement de ces flagelles se conserver pendant quatre heures.

Le stade qui précède l'apparition du mouvement montre que la coccidie a massé toutes ses granulations à la périphérie, où elles constituent une couche serrée entourant la masse claire centrale du plasma, partie qui deviendra la sphère de reliquat, et qui ne possède ni noyau, ni granulations. Les granulations périphériques sont de grosseur variée, souvent allongées et piri-formes (Pl. xvi, fig. 32).

On voit, dans les préparations colorées, que les flagelles sont constitués par un filament de chromatine autour duquel est disposée une mince couche de protoplasma. Toute la chromatine du parasite a été utilisée pour constituer les fouets qui forment l'axe du flagelle, et il ne reste ni nucléoles ni grains chromatiques dans le reliquat sphérique transparent (Pl. xvi, fig. 38).

Si l'on considère la coccidie à des stades un peu antérieurs, on voit qu'elle diffère des autres formes asporulées en voie de développement, seulement en ce que les granulations, ou plus exactement les nucléoles, sont plus nombreux et massés à la périphérie, au lieu d'être répandus dans le protoplasma (Pl. xvi, fig. 36 et 37); d'autre part, les flagelles diffèrent des mérozoïtes ordinaires par la forme allongée en fouet du nucléole, la plus grande proportion de chromatine qui entre dans sa constitution, et par leur mobilité extrême. Le nom de flagelles, que leur a valu l'analogie avec les éléments du corps mobile de Laveran qui ont reçu ce nom, est tout à fait impropre si l'on considère leur constitution et leur réelle indépendance de la sphère centrale. Ils restent accolés à celle-ci pendant le temps nécessaire pour leur permettre de s'organiser en utilisant le protoplasma cortical de la coccidie; dès qu'ils ont acquis leur longueur, qu'ils se sont distribués, pour s'en revêtir, tout ce protoplasma périphérique par lequel ils adhéraient à la sphère non granuleuse, ils se détachent naturellement de cette masse résiduelle centrale et continuent leur évolution librement. Nous proposons d'appliquer à ces pseudo-flagelles, en raison du grand noyau chromatique qui les caractérise, le nom de *Chromatozoïtes*. Nous adoptons ce terme sous les mêmes réserves que nous avons formulées à propos des dénominations de cycle *asporulé* et de *mérozoïtes*.

L'évolution des corps à chromatozoïtes avant le stade mobile nous semble différer fort peu de celle des corps en barillet : division du noyau au début de l'existence intranucléaire, puis division successive des noyaux secondaires jusqu'à ce qu'il en existe un grand nombre; enfin, et c'est là le stade où la différence se manifeste, transport de ces noyaux à la périphérie, dans la couche externe du protoplasma, qui doit seule prendre part à l'organisation des chromatozoïtes.

Le stade mobile que nous venons de décrire s'observe exceptionnellement. Metchnikoff l'a constaté une première fois au printemps de 1890; instruit par lui de son existence, nous l'avons vainement cherché pendant six mois chez un grand nombre de salamandres parasitées. Voici les conditions dans lesquelles nous l'avons rencontré : un certain nombre de salamandres conservées longtemps au laboratoire ont présenté au bout de quelques mois la guérison spontanée de la Coccidiose. Nous avons voulu les utiliser pour obtenir expérimentalement leur réinfection au moyen du kyste sporulé que nous avons montré être la forme de résistance du *Karyophagus*, et répéter au sujet du dimorphisme chez cette Coccidie l'expérience qui nous a réussi avec le *Coccidium oviforme*. Une salamandre qui a reçu des kystes mûrs a montré au bout de quelques jours, dans ses déjections, une quantité considérable de kystes de nouvelle formation; nous l'avons alors sacrifiée et autopsiée. L'épithélium intestinal contenait des *Coccidium* à tous les stades de l'un et l'autre cycle évolutif, particulièrement de nombreux barillets et des corps à chromatozoïtes.

Si l'on compare les résultats de cette autopsie avec ceux des examens pratiqués sur des salamandres conservées longtemps au laboratoire, et dont la coccidiose remonte à quelques mois, on constate que chez ces dernières les barillets sont peu abondants, et l'on ne trouve pas de formes mobiles à chromatozoïtes.

Une conclusion découle de cette comparaison, c'est que les corps à micromérozoïtes et les corps à chromatozoïtes sont des stades de début de la coccidiose, qu'ils appartiennent surtout aux premières générations asporulées de l'existence intracellulaire du *Coccidium Salamandre*. Il ne paraît pas impossible que les mêmes formes puissent se rencontrer à toutes les périodes

de l'infection, mais ce serait alors en nombre assez restreint pour que leur constatation soit très difficile, sinon impossible.

§ II. STADE A PSEUDO-FLAGELLES CHEZ LE COCCIDIUM OVIFORME ET LE COCCIDIUM PROPRIUM. — Il était naturel de penser que ce stade remarquable de corps pseudo-flagellé n'est pas spécial au *Coccidium salamandræ*; nous l'avons retrouvé chez les Coccidies du lapin et des tritons.

En exposant l'évolution du cycle asporulé du *Coccidium oviforme*, nous avons décrit une forme endogène volumineuse, dont les nombreux noyaux se disposent à la périphérie, et dont les nucléoles s'allongent ensuite en bâtonnets, puis en fouets (Pl. xvii. fig. 15 à 17). C'est là assurément le même stade pseudo-flagellé que nous avons vu mobile à l'état frais dans l'épithélium intestinal de la salamandre. Nous n'avons pu jusqu'à présent l'observer, pour le *Coccidium oviforme*, que dans les coupes fixées. Il s'y présente avec la forme d'une sphère protoplasmique non granuleuse, entièrement dépourvue de chromatine, à la surface de laquelle adhèrent une multitude de flagelles constitués par un axe de chromatine qu'enveloppe une fine gaine protoplasmique. Ces chromatozoïtes sont une forme diversement courbe, et entourent comme une chevelure la sphère de reliquat.

L'analogie de forme et de constitution de ce corps avec le stade mobile du *Coccidium salamandræ* sur les préparations fixées est telle qu'il est impossible de refuser la même mobilité aux chromatozoïtes du *Coccidium oviforme*, et de leur attribuer une signification différente.

Chez le *Coccidium proprium*, dont A. Schneider a décrit deux variétés, parasites des tritons, nous avons rencontré le stade pseudo-flagellé avec tous les caractères qu'il nous a présentés chez le *Coccidium salamandræ*. Il en diffère par un volume un peu plus considérable du corps entier et la longueur un peu plus grande des chromatozoïtes, qui mesurent chez lui 7 à 10 μ . au lieu de 6 à 8 chez le *Coccidium salamandræ*¹. Le phénomène de la mobilité à l'état frais et la succession des stades de l'évolution

1. Cette différence, ainsi que celle tirée des kystes, montre que les deux espèces *C. Salamandræ* et *C. proprium* sont bien distinctes. *Karyophagus Salamandræ* n'a donc pas pour forme sporulée *C. proprium*, comme on avait pu le supposer *a priori*.

dans les préparations fixées apparaissent identiques. Il nous suffit donc pour celui-ci de renvoyer à la description du corps pseudo-flagellé du *Coccidium salamandre* et aux figures 19 à 27 de la planche xvn. Toutes les formes représentées par ces figures proviennent d'un même triton de l'espèce *Molge vulgaris*. (*Triton taeniatus*, *Triton punctatus*).

Avec les *Coccidium* enkystés provenant de son intestin, nous avons reproduit l'infection chez d'autres *Molge* de même espèce. N'ayant pu, faute de sujets, réaliser cette infection chez des animaux nés au laboratoire, et qui en ce cas présenteraient les mêmes rigoureuses garanties d'absence de toute infection préalable que les jeunes lapins qui nous ont servi à établir la preuve expérimentale du dimorphisme évolutif du *Coccidium oriforme*, nous nous sommes procuré un assez grand nombre de tritons que nous avons conservés, isolés les uns des autres, et chez lesquels une série d'examen des déjections nous a montré l'absence de coccidiose. Ceux qui, dans ce groupe, ont subi l'infection, ont présenté à la fois des formes endogènes asporulées et des formes enkystées; au contraire ceux servant de témoins ne montraient à l'autopsie aucune forme de coccidies¹. Une série d'expériences nous a démontré que chez le Triton aussi bien que chez la Salamandre, les formes asporulées des *Coccidium* sont fragiles, incapables de résister aux agents extérieurs, qu'elles meurent très peu d'heures après l'autopsie de l'animal infecté, qu'elles disparaissent rapidement, probablement digérées, dans l'estomac d'un triton si on les y introduit, et qu'on ne peut arriver par ce procédé à réaliser une infection. Labbé, (12, page 633) déclare avoir, au moyen de ces formes asporulées qu'il appelle *Pfeifferia*, obtenu des infections expérimentales reproduisant uniquement les mêmes *Pfeifferia* dans l'épithélium intestinal, sans donner lieu à aucune formation enkystée. Comme il ne décrit pas le procédé qu'il a employé, nous ne saurions actuellement discuter ses résultats.

De même que nous avons admis la généralité du dimorphisme chez les *Coccidium* après sa démonstration expérimentale pour trois espèces vers lesquelles le hasard seul a dirigé nos études, de même, nous croyons, l'ayant rencontré chez ces

1. L'infection expérimentale, au moyen des formes enkystées, des tritons et des salamandres, réussit très irrégulièrement. Elle exige des conditions de réceptivité de la part de l'hôte que nous n'avons pu encore déterminer.

trois mêmes espèces, les seules où nous ayons eu encore l'occasion de le rechercher, que le *stade à chromatozoïtes est une forme normale de l'évolution chez tous les Coccidium*. Il se pourrait même qu'il existât plus ou moins modifié chez tous les sporozoaires.

§ III. ANALOGIES DU STADE A CHROMATOZOITES AVEC LES CORPS A FLAGELLES DE LAVERAN ET LES POLYMITUS DE DANILEWSKY. — On connaît jusqu'à présent trois espèces de sporozoaires où des formes comparables s'observent : la Grégarine géante du homard (*Porospora gigantea*) étudiée par Van Beneden¹ (4), les *Polymitus* de Danilewsky (3) et l'hématozoaire de Laveran (13). Un point qui mérite d'être signalé est la ressemblance du stade, décrit et dessiné par Danilewsky (3), qui précède l'excapsulation chez le *Polymitus*, avec le stade qui précède immédiatement celui de la manifestation de la mobilité chez le *Coccidium salamandræ*. Sakharoff a constaté que *l'axe des flagelles des Polymitus est formé de chromatine*, et que ces prolongements ne peuvent être envisagés comme des flagelles véritables. Laveran (13), Metchnikoff (17), Soulié, considèrent le corps flagellé du paludisme comme une forme bien vivante, et nullement comme un stade de dégénérescence. Cette théorie de la dégénérescence, imaginée par les savants italiens Grassi, Feletti, Celli, San Felice, puis défendue par Sakharoff et Labbé (10), a pu trouver un semblant de valeur dans le fait que les flagelles détachés meurent au bout de peu de temps, mais il ne faut pas perdre de vue que les coccidies, sous leurs formes parasitaires non enkystées, ne peuvent subsister longtemps en dehors du tissu vivant. Le laps de temps nécessaire à l'apparition des flagelles après la sortie, hors du vaisseau, de la goutte de sang paludique destinée à l'examen est un autre argument invoqué en faveur de la dégénérescence : nous pensons que les flagelles du paludisme prêts à se mettre en mouvement, ou déjà en mouvement dans le globule, sont empêchés par l'enveloppe globulaire de manifester leur présence jusqu'à ce que cette enveloppe ait cédé ; comme elle s'altère très vite hors de l'organisme, tous les corps à flagelles mûrs s'échappent et apparaissent après quelques

1. Les savants (A Schneider, Léger) qui ont étudié, postérieurement à Ed. van Beneden, l'évolution de cette grégarine n'ont pas retrouvé ce stade, et ils ont raison de dire que la spore ne doit pas en être le point de départ. Cela ne prouve pas pourtant que ce stade n'existe pas.

minutes, et pour ainsi dire tous à la fois dans la préparation. Cette interprétation est entièrement conforme aux faits décrits par Danilewsky concernant l'excapsulation des *Polymitus* chez les oiseaux.

§ IV. RÔLE DÉVOLU AUX CHROMATOZOÏTES. — Divers auteurs paraissent avoir eu sous les yeux le stade à chromatozoïtes que nous avons décrit. Podwysotsky a rencontré chez le *Coccidium oviforme* diverses étapes de son développement et les a considérées comme des formes de reproduction à microsporozoïtes. Il semble, d'après les figures de son mémoire (12) (pl. 13, fig. 12 s.), que ce soit le stade à chromatozoïtes du *Coccidium proprium* que Labbé considère comme une forme à microsporozoïtes du *Pfeifferia tritonis*, et le même stade mobile chez *Klossia Eberthi* qu'il décrit comme une forme monstrueuse à pseudosporozoïtes¹. Certaines figures de Jackson Clarke représentent probablement le corps à chromatozoïtes de la *Klossia* des limaces grises (pl. 3, fig. 7). L'interprétation la plus générale venue à l'esprit de ceux qui ont observé des chromatozoïtes est celle de microsporozoïtes. Pourtant Schuberg et Labbé². (12, p. 622) ont pensé à une conjugaison entre leurs microspo-

1. Voir fig. 8, p. 613, et fig. 9 et 10, p. 614. Schneider interprétait ce stade comme une forme cadavérique.

2. M. Labbé, dans une note présentée le 12 juin à la Société de Biologie (voir C. R. p. 569), déclare :

1° Que ce stade à chromatozoïtes n'est pas autre chose que le stade à microsporozoïtes qu'il a décrit chez sa « *Pfeifferia* » du Triton (forme asporulée du *Coccidium proprium* A. Schn.); mais que M. Simond a mal décrit et mal coloré ces sporozoïtes;

2° Que ce stade n'a rien à voir avec le « corps à flagelles » de Laveran chez l'Hématozoaire du paludisme.

En l'absence de M. Simond, j'ai répondu à M. Labbé à la séance du 19 juin (voir C. R. p. 593).

Dans les lignes du texte qui renvoient à la présente note, M. Simond fait l'historique de la question, et reconnaît lui-même que son stade à chromatozoïtes correspond au stade à microsporozoïtes de la *Pf. tritonis* de Labbé. Mais ce qu'il a le droit d'affirmer, c'est qu'il est le premier à avoir vu la généralité et l'importance de ce stade. Ses chromatozoïtes sont bien colorés dans les nombreuses préparations que j'ai examinées, et il a pu ainsi mettre en évidence les caractères si particuliers de ces cellules reproductives, avec leur noyau formé d'un énorme filament chromatique; ils rappellent tout à fait des spermatozoïdes et ils en ont l'extrême mobilité.

Pour tout esprit non prévenu, la comparaison des figures de Simond et de celles de Sakharoff (21, pl. xv fig. 15-18) pour le « corps à flagelles » des hématozoaires des oiseaux s'impose. Et ainsi se trouve confirmée cette idée que j'ai émise dès 1887 que l'hématozoaire du paludisme, très voisin de celui des oiseaux, est une coccidie.

chromatozoïtes) et leurs macrosporozoïtes (nos mérozoïtes), sans apporter aucun fait précis corroborant leur manière de voir.

Nous devons présenter avec certaines réserves, et provisoirement comme une probabilité, l'opinion qui résulte chez nous de l'étude des chromatozoïtes, touchant leur signification. Il n'est pas admissible de supposer que la coccidie trouve dans ce stade un moyen de locomotion qui lui permettrait de se transporter *entière* en un autre point du tissu, car, à suivre l'évolution de ce corps mobile, on voit jusqu'à l'évidence que *seuls les chromatozoïtes*, une fois l'enveloppe rompue, pourront sortir de la cavité intracellulaire par suite de leur séparation d'avec la sphère de reliquat. Il n'est pas douteux non plus que la rupture de l'enveloppe ne soit produite régulièrement par les mouvements si vifs des chromatozoïtes, et, en effet, on les retrouve libres dans la lumière de l'intestin. Quant à la sphère centrale, une fois abandonnée par ceux-ci, elle ne représente plus qu'un résidu protoplasmique analogue aux reliquats rencontrés dans d'autres formes de division; dépouillée de toute sa chromatine, elle ne saurait désormais jouer aucun rôle.

Nous avons été frappé de rencontrer chez le chromatozoïte deux caractères essentiels, grande proportion de chromatine et extrême agilité, dont la réunion est d'une manière générale caractéristique de l'élément sexuel mâle chez les êtres vivants. En voyant les chromatozoïtes se mouvoir hors des cellules, on est saisi par l'analogie qu'ils présentent avec des spermatozoïdes. Nous avons donc envisagé l'hypothèse d'une différenciation sexuelle chez les *Coccidium*, et dirigé de ce côté nos investigations.

S'il existe dans le cycle des *Coccidium* une conjugaison où le chromatozoïte joue le rôle de gamète mâle, il est à supposer que c'est un mérozoïte des formes de reproduction asporulée qui subit la fécondation par conjugaison avec le chromatozoïte. Nous n'avons pu jusqu'à présent surprendre cette conjugaison à l'état frais, mais nous avons observé dans nos préparations des figures qui sont très suggestives à cet égard. Chez les salamandres et les tritons, porteurs de parasites, on voit fréquemment, dans la cellule ou sur le plateau de la cellule épithéliale de l'intestin, des corps dont l'aspect est celui d'une très jeune coc-

cidie, pourvue d'un nucléole central, qui vient de perdre sa forme de mérozoïte pour devenir sphérique; dans bien des cas, ces jeunes *Coccidium* ont une partie de leur contour occupée par un corps chromatique, tantôt en forme de cordon, tantôt étalé et comme fusionné avec le plasma à sa surface, tantôt inclus à l'intérieur du plasma où il apparaît comme un second nucléole plus volumineux que le nucléole normal. Ce corps rappelle dans bien des cas un chromatozoïte. C'est surtout chez le *Coccidium oviforme* que les apparences d'une conjugaison s'accusent davantage. Nous avons indiqué, en décrivant le cycle asporulé de ce *Coccidium*, la présence constante dès le début de ce cycle, à côté du nucléole sphérique central du parasite, d'un corps énigmatique en croissant, formé de chromatine, et qui paraît à un stade plus avancé se fusionner complètement avec le nucléole vrai. (Pl. xvii, fig. 2-4). L'analogie de forme et de volume de ce corps avec un chromatozoïte est assez nette pour donner un caractère de vraisemblance très grand à notre hypothèse d'une conjugaison. L'absence de ce corps en croissant dans les formes jeunes du cycle asporulé est encore un argument en sa faveur : en effet, par analogie avec la succession de formes agames et de formes sexuées chez d'autres êtres, il est logique de penser que la conjugaison chez les *Coccidium* est le prélude du cycle sporulé, et que les séries de générations endogènes par mérozoïtes sont une forme de parthénogénèse.

Dans l'état actuel de nos connaissances, l'hypothèse d'une conjugaison chez tous les sporozoaires s'impose : cette conjugaison a été rencontrée chez quelques-uns, où elle est très imparfaitement connue, et a pu être considérée parfois comme un simple accollement sans aucune portée sexuelle. Cependant, Wolters (28) paraît avoir établi définitivement que chez le *Monocystis* elle est caractérisée par la fusion des éléments nucléaires. Labbé (10) a signalé un phénomène du même genre pour le *Drepanidium* des grenouilles et l'*Hemogregarina* du lézard. A propos de ces deux espèces, nous devons noter que l'identité des formes très mobiles avec celles qu'on rencontre immobiles dans les globules sanguins n'est point démontrée, et qu'il y aurait intérêt à rechercher si les premières, douées d'une motilité surprenante, ne constituent pas des éléments mâles analogues aux chromatozoïtes. Dans un groupe d'êtres aussi homogène que

celui des sporozoaires, il est difficile de penser qu'un phénomène aussi important que la conjugaison existe à l'état isolé. Nous poursuivons actuellement, sur un certain nombre de coccidies, nos recherches dans cette voie.

IV

Conclusions.

D'après les faits que nous avons exposés concernant l'évolution des *Coccidium*, on pourrait être tenté d'admettre non plus un dimorphisme, mais un polymorphisme évolutif pour les coccidies. Il faut considérer cependant que toutes les formes de division asporulée sont morphologiquement voisines et constituent des modalités d'un même processus évolutif. Il n'y a réellement pour les *Coccidium* que deux modes de reproduction, l'un asporulé, l'autre sporulé; le premier jouit d'un polymorphisme en rapport avec des conditions particulières, tandis que le second présente dans son cycle évolutif, et dans la forme de résistance qui est son dernier stade, des caractères de fixité qui font de lui le mode essentiel et typique de la reproduction.

Loin d'admettre l'opinion de Labbé (12), lequel identifie le segment de la coccidie qui va devenir un mérozoïte dans le cycle asporulé au sporoblaste formé dans un kyste, et assimile le mérozoïte issu d'une segmentation intracellulaire à la spore, nous pensons que les deux modes sont morphologiquement et physiologiquement distincts. On pourrait comparer cette propriété des *Coccidium* de fournir des générations asporulées à celle de se reproduire un grand nombre de fois par scissiparité, entre deux conjugaisons, que manifestent certains Ciliés, ou encore à la segmentation qui permet à un bacille de pulluler indépendamment de la formation d'endospores, comme cela a lieu pour le charbon par exemple. Le *Coccidium* possède ainsi un moyen de multiplication temporaire rapide, en rapport avec des conditions de vitalité propre et de milieu, qui finit par s'épuiser. A ce moment, pour assurer la perpétuité de l'espèce, le parasite doit aboutir à une forme de résistance, la spore, et très probablement la production de cette spore exige un acte sexuel.

Le polymorphisme du cycle évolutif nous permet de penser

que l'histoire de la plupart des coccidies, jusqu'à présent caractérisées par un seul mode de reproduction, est à modifier ainsi que leur classification. Nous avons montré que les genres *Karyophagus* et *Pfeifferia* appartenaient au genre *Coccidium*. Les *Eimeria* doivent se ranger également dans des genres pourvus de spores durables, comme Léger (15) l'a observé pour diverses espèces.

L'étude de l'évolution des *Coccidium* *oviforme*, *C. proprium*, *C. salamandra*, nous amène à formuler une conception nouvelle des êtres appartenant au groupe des coccidies : leur caractère le plus saillant est cette faculté de multiplication par mérozoïtes, pendant la vie intra-cellulaire, en vertu de laquelle l'individu issu d'une forme sporulée est doué d'une énergie reproductrice qui lui permet d'adopter les moyens les plus avantageux pour se multiplier. Cette propriété se continue chez un nombre de générations fort variable, par suite de conditions multiples qui nous échappent, mais elle va progressivement en s'affaiblissant jusqu'au moment où l'organisme est incapable d'une nouvelle division directe. Il paraît devoir alors subir la conjugaison pour aboutir à la formation de spores, condition du rajeunissement de l'espèce. La sporulation est le terme obligé de toutes les générations asporulées.

Van Tieghem considère comme individu, dans le règne végétal, seulement l'individu spécifique, c'est-à-dire d'après F. Houssay (9) « toute la masse matérielle allant de l'œuf à l'œuf, agglomérée ou fragmentée, simple ou rameuse, dont les rameaux sont semblables entre eux ou différenciés ». N'y a-t-il pas lieu d'appliquer ici cette définition que F. Houssay estime convenir également aux êtres du règne animal? Dans le cas des *Coccidium*, toutes les formes asporulées qui se succèdent allant d'une spore mère à une spore fille, cette dernière comprise, constitueraient non plus une série de générations et un grand nombre d'individus, mais un seul individu et une seule génération. C'est à une fragmentation plus ou moins répétée, non à une reproduction, que correspondrait le cycle asporulé; la reproduction vraie, celle qui perpétue l'espèce, se réduirait à la sporulation, probablement précédée d'une conjugaison. Suivant l'expression de F. Houssay, « il n'y a plus alternance de générations, mais seulement individu formé de fragments polymorphes, dont l'un

ou dont quelques-uns seulement sont capables de différencier des éléments sexuels ».

Les faits nouveaux que nous avons observés jettent une vive clarté dans l'histoire naturelle du parasite de la fièvre paludéenne découvert par Laveran : Metchnikoff (16) a montré le premier les affinités de cet hématozoaire avec le groupe des coccidies; tous les faits observés au cours de nos recherches viennent à l'appui de ses assertions. Le stade mobile des *Coccidium* en particulier donne l'explication la plus rationnelle de l'existence des *corps à flagelles* du paludisme et des *Polymitus* des oiseaux. Ce sont, selon toute probabilité, les mêmes stades chez les hématozoaires, et nous devons ici, comme chez les *Coccidium*, admettre la possibilité d'une conjugaison nécessaire pour la production d'une forme de résistance. D'autre part, le polymorphisme du cycle asporulé pendant la vie parasitaire du *Coccidium* donne la clef du polymorphisme rencontré chez les hématozoaires de Laveran et de Danilewsky, polymorphisme qui a fait admettre par certains savants une multiplicité fort improbable d'espèces ou de genres ¹.

Enfin cette étude des *Coccidium* apporte un nouvel appui à l'opinion professée par Metchnikoff et R. Pfeiffer que le miasme de la fièvre palustre doit être une forme de résistance sporulée analogue à celle des *Coccidium*.

Notre excellent maître, M. le professeur Metchnikoff, nous a été, pendant le cours de ces recherches, non seulement un guide sûr, mais aussi un précieux collaborateur. Nous lui adressons ici le témoignage de notre vive gratitude.

1. Tels sont les genres *Hæmamaeba* et *Laverania* Grassi et Felletti, pour le parasite malarique, et les *Proteosoma* et *Halteridium* Labbé, pour l'hématozoaire de l'alouette.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE XVI

Cycle sporulé du Coccidium salamandræ.

Fig. 1. — Jeune stade accolé au noyau de la cellule, ne contenant pas encore de granulations, mais seulement un nucléole central. (État frais.)

Fig. 2 et 3. — Stades plus avancés, granuleux, à l'intérieur du noyau de la cellule hôte. (État frais.)

Fig. 4. — Stade enkysté dans le noyau de la cellule. (État frais.)

Fig. 5. — Le même stade enkysté libre, tel qu'on le rencontre dans l'intestin. (État frais.)

Fig. 6. — Rétraction de la masse granuleuse du kyste placé en chambre humide; 3^e jour. (État frais.)

Fig. 7. — Division de la masse granuleuse en deux parties pourvues chacune d'un noyau; 3^e jour. (État frais.)

Fig. 8. — Division de la masse granuleuse en quatre sporoblastes; ce stade suit de très près celui de la figure 7. (État frais.)

Fig. 9. — Kyste renfermant quatre spores mûres dont une est en dessous du plan mis au point; 12^e jour. (État frais.)

Fig. 10. — Kyste mûr depuis longtemps : la paroi ramollie se moule sur les quatre spores, dont une est au-dessous du plan mis au point. (État frais.)

Fig. 11. — *a.* spore mûre hors du kyste; *b.* sporozoïte. (État frais.)

Fig. 12, 13 et 14. — Stades correspondant à une des figures 2, 3, 4, dans une préparation fixée au liquide de Flemming et colorée à la safranine. On voit, dans les figures 13 et 14, les granules graisseux mélangés aux granules chromatiques; les granules plastiques n'apparaissent pas, parce qu'ils ont subi la décoloration.

Cycle asporulé du Coccidium salamandræ.

Fig. 15. — Même stade au début que celui de la figure 1, dans le noyau. (État frais.)

Fig. 16 et 17. — Stade montrant la division du noyau en deux, puis en quatre. (État frais.)

Fig. 18. — Stade qui précède la formation des mérozoïtes; la cavité formée par la membrane du noyau hôte renferme un certain nombre de petites sphères nucléées qui vont devenir des mérozoïtes. (État frais.)

Fig. 19. — Parasite divisé en un certain nombre de mérozoïtes disposés en barillet dans la cavité du noyau hôte. On distingue un reliquat de segmentation *r.* (État frais.)

Fig. 20. — Deux mérozoïtes libres dont on distingue le noyau. (État frais.)

Fig. 21, 22, 23, 24, 25. — Stades correspondant à ceux des figures 15, 16, 17 et 18. On voit qu'à un certain moment de la période de division nucléaire, le nucléole, d'abord massif, se fragmente en un nombre limité de petits grains nucléaires disposés circulairement dans le noyau du futur mérozoïte. (Coloration à la safranine.)

Fig. 26. — Parasite divisé en mérozoïtes et sorti de la cellule hôte. Le noyau du mérozoïte renferme, comme au stade précédent, un certain nombre de nucléoles placés en cercle. (Coloration à la safranine.)

Fig. 27. — Parasite divisé en un très grand nombre de mérozoïtes plus petits que ceux ordinaires, et doués d'une mobilité restreinte. L'un d'eux a crevé l'enveloppe formée par la membrane de la cellule hôte, pour sortir. Cette forme à micromérozoïtes est rare.

Fig. 28. — Un mérozoïte provenant du stade représenté par la figure 27, et représenté avec les diverses formes qu'il prend successivement à l'état libre.

Fig. 29. — Autre forme de division asporulée qui est peut-être le stade antérieur à la précédente, et peut être considérée comme un corps à micromérozoïtes.

Cycle asporulé du Coccidium salamandræ aboutissant au corps à chromatozoïtes.

Fig. 30. — Stade où le parasite renferme un petit nombre de noyaux secondaires en voie de division. (État frais.)

Fig. 31. — Stade plus avancé; la division des noyaux est terminée et ceux-ci se sont portés à la périphérie du parasite. (État frais.)

Fig. 32. — Stade qui précède immédiatement la formation des chromatozoïtes, vue en coupe optique. (État frais.)

Fig. 33. — Stade mobile au début de la manifestation des mouvements des chromatozoïtes dans la cavité formée par la membrane du noyau hôte. (État frais.)

Fig. 34. — Corps à chromatozoïtes en partie détachés et mobiles dans la cavité. C'est le même parasite que dans la figure 33, vu 40 minutes plus tard.

Fig. 35. — Corps à chromatozoïtes mis en liberté par rupture de la cellule qui le contenait, rupture déterminée par compression.

Fig. 36, 37, 38. — Stades correspondant à ceux des figures 31, 32 et 34, dans une préparation colorée à la safranine et au picro-indigo-carmin.

PLANCHE XVII

Cycle sporulé du Coccidium oviforme.

Fig. 1. — Jeune stade dans la cellule épithéliale.

Fig. 2. — Jeune stade dans la cellule épithéliale montrant, près du nucléole sphérique, le corps chromatique en croissant.

Fig. 3. — Stade plus avancé où ont apparu les granulations chromatiques.

Fig. 4. — Stade où les granulations chromatiques sont devenues plus abondantes. C'est à ce moment que le nucléole en croissant disparaît en se fusionnant avec le nucléole sphérique. Le noyau de la cellule hôte et cette cellule manifestent une dégénérescence avancée.

Fig. 5. — Stade d'arrangement et de tassement des granules chromatiques à la périphérie avant l'enkystement.

Fig. 6. — Stade où le parasite a pris la forme ovale, indiquant qu'il est prêt à s'enkyster.

Fig. 7. — Stade montrant la déformation et la fusion des granules chromatiques périphériques au moment où se constitue la membrane kystique.

Fig. 8. — Stade qui suit l'enkystement; apparition de globules graisseux autour du noyau de la coccidie.

Fig. 18. — Kyste mûr de *Coccidium oviforme* montrant la constitution du micropyle : *a*, kyste normal; *b*, kyste écrasé, les deux membranes d'enveloppe ont été séparées par l'écrasement, et l'on voit l'ouverture micropylaire qui existe seulement pour la membrane externe.

Cycle asporulé du Coccidium oviforme.

Fig 9. et 10. — Très jeune stade où se fait la division initiale du noyau de la coccidie.

Fig. 11 et 12. — Stades plus âgés montrant la continuation du processus de division du noyau de la coccidie.

Fig. 13. — Constitution des sphères nucléées qui vont devenir les mérozoïtes. Le parasite, ainsi divisé, est représenté renfermé dans l'enveloppe que lui constitue la cellule hôte réduite à une membrane; on reconnaît encore le noyau dégénéré de cette cellule sous forme d'un croissant linéaire.

Fig. 14. — Parasite complètement divisé en mérozoïtes. On n'a pas représenté l'enveloppe que lui forme la cellule hôte dégénérée et qui diffère pas de celle figurée au stade précédent. (État frais.)

Cycle endogène du corps à chromatozoïtes.

Fig. 15. — Stade montrant la continuation du processus de division nucléaire indiqué par les figures 9, 10, 11 et 12.

Fig. 16. — Stade où le parasite a atteint son plus grand développement : la division nucléaire est arrêtée et les noyaux s'allongent en bâtonnets après s'être portés à la périphérie du corps protoplasmique.

Fig. 17. — État parfait du corps à chromatozoïtes, ceux-ci sont disposés à la surface d'un volumineux reliquat.

Cycle du corps à chromatozoïtes du Coccidium proprium.

Fig. 19 et 20. — Aspect en coupe optique et en surface du stade qui précède celui des pseudo-flagelles. (État frais.)

Fig. 21. — Stade pseudo-flagellé mobile avant la séparation des chromatozoïtes d'avec le corps de reliquat. (État frais.)

Fig. 22, 23, 24, 25, 26. — Succession des stades qui précèdent la formation des chromatozoïtes. (Coloration à la safranine.)

Fig. 27. — Corps à pseudo-flagelles, observé dans l'intérieur de la cellule-hôte. (Safranine.)

Fig. 28. — Forme ordinaire de reproduction asporulée chez le *Coccidium proprium*.

Fig. 29. — Kyste mûr du *Coccidium proprium* montrant les quatre spores et le reliquat de segmentation pourvu d'une vacuole. Ce kyste et toutes les formes représentées par les figures 10 à 29 proviennent de l'intestin d'un même individu de l'espèce *Molge vulgaris*.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE¹

1. E. VAN BENEDEN. — Recherches sur l'évolution des grégaires. *Bull. Ac. roy. de Belgique*, 2^e série, t. 31, 1871, et *Quart. Journ. of Microsc. Sc.* vol. XI, 1871, p. 242.
2. J. CLARKE. — Observations on various sporozoa. *Quart. Journ. of microsc. science*. Vol. XXXVII, p. 287-303, pl. 30, 33.
3. DANILEWSKI. — Parasitologie comparée du sang. Kharkoff, 1889.
4. — — — Leucocytozoaires des oiseaux. *Ann. Inst. Past.* IV, 1890 p. 427-432, pl. 7 A.
5. — — — Maladie aiguë des oiseaux. *Ibid.*, 4, 1890, p. 753-760.
6. — — — Microbiose malarique. *Ibid.*, 5, 1891, p. 759-783, pl. 19.
7. DRUNER. — Beiträge sur Kenntniss der Kern und Zellendegeneration und ihrer Ursache. *Jenaische Zeitschr.* XXIII, 1894.
8. HENNEGUY. Formation des spores chez la grégarine du lombric. *Ann. de micrographie*. I, 1888-89, p. 97-108, pl. 1.
9. HOUSSAY. — Le Rappel ontogénétique d'une métamorphose chez les vertébrés. *Anat. Anzeiger*, XIII, nos 1 et 2, 1897.
10. LABBÉ. — Recherches sur les parasites endoglob. du sang. *Archiv. zool. expériment.* 3^e série, tome II, 1894, p. 1-10, pl. 55-259.
11. — — — Les Coccidies des oiseaux. *C. R. Ac. Sciences*. Vol. 116, 1893, p. 1300-1303.
12. — — — Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur les coccidies. *Archives zool. expériment. et générale*. 3^e série, t. IV, 1896, p. 517-655, pl. 12-18.
13. LAVERAN. — Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme, p. 46. Paris, 1881. — *Société médicale des hôpitaux*, 28 avril 1882. — *Revue scientifique*, 29 avril 1882.
14. LE DANTEC. Les Sporozoaires. *Encycl. des Aide-mémoire Léauté*. Paris, 1895.
15. LÉGER. — Le Cycle évolutif des coccidies chez les arthropodes. *C. R. Soc. Biologie*. 1^{er} mai 1897, p. 382-385, et *C. R. Ac. Sciences*, t. CXXIV. 1897, p. 966-969.

1. Nous ne citons que les mémoires dont nous avons parlé dans notre travail. On trouvera, dans le dernier travail de M. Labbé, une bibliographie très complète des coccidies.

16. METCHNIKOFF. — *Centr. f. Bakt.* I, 1887, p. 624. (Analyse).
 17. — — Carcinomes et coccidies. *Revue générale des sciences.* III, 1892, p. 629-635.
 18. MINGAZZINI. — Contributo alla conoscenza degli sporozoi. *Mem. lab. anat. normale Roma.* III, p. 31-83, pl. 1-3.
 19. R. PFEIFFER. — Beiträge zur Protozoenforschung. I. Die Coccidienkrankheit der Kaninchen. Berlin, 1892.
 20. PODWYSSOBVKY. — Zur Entwicklungsgeschichte des *Coccidium ovi-forme* als Zellschmarotzers. *Biblioth. medica*, Abthl. D. II.
 21. SAKHAROFF. — Hématozoaires des oiseaux. *Ann. de l'Institut Pasteur.* VII, 1893, p. 801-812, pl. 15.
 22. A. SCHNEIDER. — Coccidies nouvelles ou peu connues. *Tablettes zool.* I. 1886.
 23. — — Le Cycle évolutif des coccidies. *Tabl. zool.* II. 1992.
 24. SCHUBERG. — Ueber Coccidien der Mause darmes. *Sitzber. d. Wurzburg.* 18 mars 1892.
 25. SIMOND. — Dimorphisme évolutif de la coccidie appelée *Karyophagus salamandræ* Steinhaus. *C. R. Soc. Biologie* 12, déc. 1896.
 26. — — Formes de reproduction asporulée dans le genre *Coccidium*. *C. R. Soc. Biologie*, 1^{er} mai 1897, p. 425-428.
 27. STEINHAUS. — *Karyophagus salamandræ*. *Virchow's Archiv.* T. CXIV 1888, p. 176-180, pl. V.
 28. WOLTERS. — Die Conjugation und Sporenbildung bei Gregarinen. *Arch. f. mikr. Anat.* Vol. XXXVII, 1891, p. 99.
-

RECHERCHES

SUR L'AGGLUTINATION DU BACILLUS TYPHOSUS

PAR DES SUBSTANCES CHIMIQUES

PAR E. MALVOZ

(Institut d'anatomie pathologique et de bactériologie de l'Université de Liège.)

On ne peut guère examiner sous le microscope de phénomène plus curieux que celui de l'agglutination de certains microbes par les sérums spécifiques. Que l'on prenne, par exemple, une émulsion de bacilles typhiques ou cholériques, que l'on y ajoute une trace de sérum provenant d'un animal fortement immunisé contre le typhus ou le choléra, et l'on sera frappé des modifications considérables qui s'accomplissent dans la préparation. Les bacilles qui, avant l'addition du sérum, étaient d'une mobilité extrême, bien séparés les uns des autres, s'arrêtent presque tous. Bientôt, on les voit se rapprocher, comme par une attraction mystérieuse, et peu à peu ils se groupent en amas de plus en plus considérables : ils *s'agglutinent*, et la préparation ne contient plus, après un certain temps, que des flocons nageant dans le liquide, formés de bacilles agglomérés.

Ce phénomène, découvert et étudié par Charrin et Roger, Metschnikoff, Bordet, Gruber et Durham, Pfeiffer, etc., a reçu, on le sait, d'importantes applications cliniques : son existence, démontrée par Widal dans le sang des typhisés, est devenue la base du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde.

Chose étrange, malgré d'innombrables travaux publiés dans ces derniers temps sur la séro-diagnose, on ne sait pour ainsi dire rien du mécanisme intime du phénomène. Pourquoi, par exemple, un sérum actif n'agglutine-t-il bien que des bacilles déterminés, à l'exclusion d'autres espèces microbiennes, même

très voisines? Bien que la plupart des questions soulevées par le phénomène de l'agglutination n'aient pas encore reçu de réponse, on a déjà voulu tirer des conclusions générales sur son existence, et en faire la base d'une théorie de l'immunité. De telles théories seront évidemment prématurées aussi longtemps que les obscurités qui entourent l'étude du phénomène ne seront pas éclaircies.

Il nous a paru qu'on ferait avancer la question en recherchant quelles sont les principales substances chimiques qui sont capables de produire *in vitro*, tout comme le sérum spécifique, l'agglutination du *bacillus typhosus*, et dans quelles conditions cette agglutination se produit; de plus, le phénomène lui-même n'est-il pas, au même titre que le typhus-sérum, applicable au diagnostic du bacille d'Eberth-Gaffky?

Cette question des substances chimiques capables de provoquer l'agglutination semble avoir été fort peu étudiée. A notre connaissance, seuls Blachstein¹ et Engels² ont fait quelques recherches sur ce sujet. Ils ont étudié l'action agglutinante de la chrysoïdine, substance colorante diazoïque, sur le bacille cholérique. Tandis que Blachstein soutient que seul le vrai bacille cholérique est agglutiné par cette substance, à l'exclusion des autres vibrions voisins du choléra, Engels affirme que la chrysoïdine n'a pas d'action spécialement élective sur le bacille virgule spécifique.

Pour nous placer dans des conditions toujours comparables, nous avons pris, dans tous nos essais, des cultures fraîches sur gélose, ayant séjourné quelques heures à 37°. Le bacille typhique provenait de la rate d'un cadavre. On délaye une anse de la culture dans 1 c. c. d'eau distillée : on obtient ainsi une émulsion ne présentant au microscope que des bacilles bien mobiles, nettement isolés et nullement agglutinés. On s'assure, d'ailleurs, à chaque expérience, que l'émulsion ne présente pas spontanément d'amas microbiens.

Nous avons tout d'abord constaté que le typhus-sérum, provenant soit d'un vrai typhique, soit d'une chèvre fortement immunisée, produisait, à la dose d'une goutte pour 1 c. c. d'émulsion de bacilles typhiques, de beaux amas caractéristiques.

1. *Munchener medicinische Wochenschrift*, nos 44 et 45, 1896.

2. *Centralblatt für Bakteriologie*, n° 3, vol. 21, 1897.

Nous avons ensuite ajouté à nos bacilles émulsionnés les substances chimiques les plus variées. Nous n'avons été nullement surpris de constater qu'un bon nombre de substances, jouissant de propriétés coagulantes, agglutinaient plus ou moins fortement les bacilles typhiques, tout comme le typhus-sérum. En tête de ces substances, nous plaçons la formaline (aldéhyde formique à 40 0/0 dans l'eau), le sublimé corrosif, l'eau oxygénée, l'alcool fort.

La concentration des milieux en présence joue naturellement un très grand rôle.

Pour la formaline, on ne voit apparaître d'amas bien nets, semblables à ceux que provoque dans l'émulsion le typhus-sérum, que si l'on ajoute, pour 1 c. c. d'émulsion, 1 c. c. de formaline.

Le sublimé agglutine fortement le bacille typhique déjà à la dose de 0,7 p. 1,000; c'est-à-dire qu'en déposant une anse de cette solution sur le porte-objet, et l'additionnant d'une anse d'émulsion typhique, on assiste de suite à la formation de beaux amas. Ceux-ci sont de plus en plus volumineux, au fur et à mesure que l'on augmente la concentration du réactif.

Une anse d'alcool fort, d'eau oxygénée, mélangée à une anse d'émulsion typhique, provoque aussi la formation de beaux amas microbiens.

L'agglutination provoquée par ces réactifs est tellement nette qu'elle nous sert d'expérience de cours, quand nous voulons montrer l'aspect que prennent les bacilles typhiques réunis en amas, lorsque nous n'avons pas de typhus-sérum à notre disposition.

Mais ces divers réactifs ont une action coagulante prononcée et leur propriété d'agglutiner les bacilles n'a, semble-t-il, rien de bien surprenant; de plus, le phénomène exige pour se produire d'assez fortes concentrations des réactifs. Quelle différence, à ce point de vue, avec le typhus-sérum! N'existe-t-il donc pas des substances chimiques produisant, comme ce dernier, le phénomène à des doses excluant l'hypothèse de la production d'une simple coagulation? Nous avons essayé d'abord la chrysoïdine qui, d'après Blachstein, agglutine le bacille cholérique. Nos émulsions typhiques n'ont pas présenté d'agglutination nette aux concentrations variées de chrysoïdine que nous avons

employées¹. Nous avons alors eu recours à d'autres corps, et nous avons choisi ceux qui présentent des groupements moléculaires plus ou moins voisins de la chrysoïdine, tels que l'induline, la nigrosine, la safranine, la vésuvine². L'induline et la nigrosine n'ont pas produit l'agglutination. Mais la safranine et la vésuvine représentent deux substances qui, *même à très faible concentration*, provoquent au sein d'une émulsion de bacilles typhiques la formation d'amas très caractéristiques.

En prenant une anse d'une solution de safranine ou de vésuvine à 1 p. 1,000, et en l'ajoutant à une anse d'émulsion typhique, on voit bientôt, sous le microscope, l'immobilisation des bacilles et leur réunion en amas, d'autant plus reconnaissables que les microbes sont légèrement teintés en rose et en brun. Même en poussant plus loin la dilution, on obtient encore l'agglutination. Si, par exemple, on ajoute à 1 c. c. d'émulsion typhique 3 gouttes de safranine ou de vésuvine à 1 pour 1,000, on voit déjà des amas apparaître dans les préparations. *Le sang de bien des typhiques ne se comporte pas autrement.*

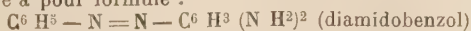
Nous sommes donc en possession de substances qui, même très diluées, provoquent facilement des amas de bacilles typhiques, comparables à ceux du typhus-sérum.

À l'inverse de la formaline, du sublimé, de l'alcool, etc., les acides minéraux n'agglutinent pas le bacille typhique, qu'ils soient employés dilués ou concentrés. On voit bien, dans les expériences, les bacilles devenir de plus en plus petits au fur et à mesure que l'on emploie un acide plus concentré, mais les microbes ne s'agglutinent pas.

L'acide phénique, l'acide lactique, le chloroforme ne provoquent pas, non plus, d'amas microbiens.

L'acide salicylique agglutine, mais les amas ne sont formés que d'un petit nombre de microbes. Le permanganate de potassium, en solution concentrée dans l'eau, ajouté à l'émulsion typhique, rassemble les bacilles en îlots dans lesquels ils sont beaucoup moins serrés qu'après l'action des substances véritablement agglutinantes.

1. La chrysoïdine est une matière colorante jaune brunâtre, vendue par Merck, à Darmstadt. Elle a pour formule :



2. La formule de la vésuvine est : $\text{C}^6\text{H}^4 < \begin{matrix} \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^3 (\text{N H}^2)^2 \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^3 (\text{N H}^2)^2 \end{matrix}$

La soude caustique, l'ammoniaque ne donnent pas d'amas bacillaires si l'émulsion de microbes est faite dans l'eau distillée. Mais si, au lieu d'eau distillée, on emploie une eau alimentaire quelque peu dure, l'addition de soude ou d'ammoniaque à l'émulsion agglutine fortement les microbes. Ce phénomène est sans doute en rapport avec la précipitation du carbonate de chaux formée aux dépens du bicarbonate soluble. Cette simple expérience montre combien le phénomène de l'agglutination dépend de circonstances en apparence peu importantes. Il serait désirable de voir les bactériologistes se mettre d'accord sur le choix d'un milieu toujours le même, de composition simple, pour l'étude du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. Rien n'est variable comme la composition d'un bouillon de culture, et peut-être faut-il expliquer par cette variété des bouillons employés, bien des divergences notées d'un auteur à l'autre dans les constatations faites sur le sang des typhisés.

Soumise à l'ébullition, puis refroidie, l'émulsion typhique agglutine encore bien par la formaline.

Salimbeni¹ tend à faire jouer un grand rôle à l'action de l'oxygène dans la production du phénomène de l'agglutination par les sérums spécifiques.

M. Lambotte a fait ici quelques expériences qui n'ont pas donné les mêmes résultats que ceux de Salimbeni. Il est vrai que la technique employée n'était pas la même. M. Lambotte s'est servi d'une chambre à gaz porte-objet de Ranvier. On dépose au centre de la plaque une goutte d'émulsion typhique. On introduit dans la rainure soit un peu de typhus-sérum dilué, soit de la formaline. On recouvre d'une lamelle lutée à la vaseline. On arrive facilement à éviter le mélange des réactifs et des bacilles. On s'assure d'abord sous le microscope que ceux-ci sont bien isolés et bien mobiles. On fait passer pendant longtemps un courant de gaz inerte (gaz d'éclairage, hydrogène). Quand tout l'air est chassé, on opère le mélange en secouant la plaque, et on constate que l'agglutination des bacilles est tout aussi nette que dans une préparation ordinaire.

On peut donner facilement à un sérum normal non agglutinant le pouvoir de provoquer la formation d'amas bacillaires dans une émulsion typhique; en d'autres termes, on peut trans-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, Mars 1897.

former artificiellement du sérum normal en typhus-sérum, tout au moins au point de vue de l'agglutination. Pour cela, nous avons pris du sérum de bœuf, dont nous avons de grandes quantités à notre disposition. Ce sérum de bœuf, comme nous nous en sommes assuré, n'agglutinait pas à la dose de 1 de sérum pour 10 d'émulsion typhique. Mais si on ajoute à 9 c. c. de ce sérum pur, 1 c. c. de solution de safranine à 1 0/00 (cette addition ne provoque pas d'altération visible du sérum), on obtient ainsi un sérum dont une goutte provoque facilement la formation d'amas bacillaires dans 20 gouttes d'émulsion typhique. Et pourtant la safranine est là dans un état de dilution très considérable. A ce degré de dilution, la safranine seule, non additionnée de sérum, ne provoque pas l'agglutination des microbes typhiques.

Y aurait-il dans le sang des typhiques et des animaux, soumis à l'influence du bacille typhique, quelque produit de désassimilation, d'une constitution moléculaire plus ou moins voisine de celle de la safranine, de la vésuvine, etc.? Ce produit existerait-il seulement dans les organismes influencés par le bacille typhique, ou bien, présent normalement dans le sang, se formerait-il en plus grande quantité chez les typhisés?

Ce sont là des questions que nous ne pouvons pas résoudre pour le moment. Nos essais provoqueront peut-être des recherches dans cette voie. Nous signalerons, en passant, ce fait que la diazo-réaction d'Ehrlich, si souvent observée dans l'urine des typhiques, est due à la décomposition d'amines de la série aromatique par l'acide nitreux, avec formation de corps diazoïques colorés. Le sang des typhiques contient donc, semble-t-il, des corps à molécule compliquée et facilement décomposable en dérivés diazoïques. Or, la vésuvine, qui agglutine si bien à très faible dose le bacille typhique, est un corps azoïque. Ces données inciteront peut-être quelqu'un à chercher dans cette direction la véritable nature de la substance agglutinante du sang des typhiques.

*
* *

Le fait de l'agglutination du bacille typhique par des réactifs chimiques présente, par lui-même, et à divers points de vue, un grand intérêt. Mais cet intérêt grandit encore si on étudie com-

ment se comportent, vis-à-vis de ces réactifs, d'autres microbes plus ou moins voisins du bacille typhique.

On sait que l'on a fait, de l'emploi du typhus-sérum ou du choléra-sérum, la base d'un procédé de diagnostic des bacilles typhiques et cholériques. Le bacille typhique, par exemple, est facilement agglutiné par le typhus-sérum dilué : traités par le même sérum, les coli-bacilles ne se rassemblent pas en amas. Si donc on se trouve en présence de microbes difficiles à identifier, soit comme bacilles typhiques, soit comme coli-bacilles, on n'a qu'à les soumettre à l'action du typhus-sérum convenablement dilué. Si l'on observe la formation d'amas bacillaires, on a affaire au bacille typhique; l'absence d'amas prouve qu'il ne s'agit pas de ce microbe.

Eh bien, on constate des différences aussi importantes dans l'action de la formoline, du sublimé, de l'eau oxygénée, de la safranine, etc., sur les émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles.

Nous avons dit déjà que, pour éviter la complication des phénomènes qui se produisent quand on emploie, pour l'étude de l'agglutination par du sérum ou des réactifs, des cultures en bouillon ou en eau-peptone, nous prenions toujours des émulsions dans l'eau distillée de bacilles recueillis sur gélose. Si on fait ainsi des émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles, pris sur cultures de même âge, et que l'on ajoute de la formoline, de l'eau oxygénée, dans les proportions déjà indiquées, on observe nettement l'agglutination du bacille typhique et l'absence de ce phénomène pour le coli-bacille. La différence est particulièrement nette avec la formoline. Tandis que l'addition des parties égale d'émulsion typhique et de formoline est suivie de la formation d'amas de bacilles agglutinés, les coli-bacilles immobilisés restent isolés dans les préparations. La différence d'une émulsion à l'autre est même visible à l'œil nu : l'émulsion typhique est transformée en un liquide rempli de flocons blanchâtres. Le phénomène est tellement net qu'il peut servir comme méthode de diagnostic. C'était devenu, à un moment donné, une des distractions du laboratoire, que de faire faire par les visiteurs un grand nombre d'émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles, et de reconnaître à l'œil nu, rien qu'au moyen de la formoline, quelle était la nature du

microbe contenu dans le tube à essai qu'ils vous présentaient.

La safranine à 1 pour 1,000 ajoutée à 1 c. c. d'émulsion typhique, donne déjà des amas à la dose de 1 pour 10 d'émulsion; le coli-bacille n'est pas agglutiné dans ces conditions, pas plus que si on prend de la safranine à 1 pour 100. Le sérum additionné de safranine, comme il a été indiqué, se comporte vis-à-vis des émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles comme le typhus-sérum dilué. On prend 20 gouttes d'émulsion typhique et d'émulsion de coli-bacilles; on ajoute à chaque tube 2 gouttes de sérum de bœuf additionné de safranine à 1 pour 1000 (9 de sérum + 1 de la solution de safranine). Des amas bacillaires très nets se forment dans les cultures typhiques; on n'en voit pas, ou à peine quelques bacilles groupés par deux ou trois, dans l'émulsion de microbes du côlon.

On doit se demander si ces différences si nettes d'un microbe à l'autre ne sont pas dues à la présence, dans l'émulsion de bacilles du côlon, de substances telles que des substances ammoniacales formant des combinaisons avec l'aldéhyde formique, etc. Il est clair que la même objection peut être faite au procédé du diagnostic par le typhus-sérum, avec d'autant plus de raisons que très souvent cette recherche s'effectue, non pas au moyen de bacilles émulsionnés dans l'eau distillée, mais de cultures en bouillon renfermant tous les produits, tels qu'ammoniaques, amines, etc., fabriqués par les bacilles. Néanmoins, dans le but de rendre les essais aussi comparables que possible, nous avons cherché à débarrasser complètement les bacilles typhiques et les coli-bacilles des substances solubles de la culture. Dans ce but, nous avons fait passer, à travers de petites bougies Chamberland reliées à la trompe, des cultures typhiques et des cultures de bacilles du côlon en bouillon de viande. Nous avons ensuite lavé les dépôts à grande eau (eau distillée) jusqu'à ce qu'on n'obtienne plus de réaction par le réactif de Nessler. En raclant ensuite la surface de la bougie et en délayant dans l'eau distillée, on produit des émulsions riches en bacilles. Mais ceux-ci sont ou très peu mobiles, ou même complètement immobiles; la recherche des cils est devenue infructueuse. De plus, on n'observe plus, avec l'émulsion typhique, la production d'amas si remarquable que l'on obtenait au moyen de la formaline, du sublimé, de la safranine, etc. Le typhus-sérum

lui-même n'agglutine pour ainsi dire plus ces bacilles lavés.

Coli-bacilles et bacilles typhiques, ainsi traités, se comportent donc sensiblement de la même façon. Les grands lavages subis par les microbes ont sans doute pour effet de les dépouiller de l'enveloppe ciliée qui entoure le corps bacillaire, et cette enveloppe est peut-être le siège des réactions chimiques qui s'accomplissent dans le phénomène de l'agglutination.

Quoi qu'il en soit, la méthode de diagnostic que nous proposons, employée de la façon indiquée, nous paraît susceptible d'applications pratiques. MM. Lambotte et Bossart ont fait, à notre laboratoire, un grand nombre de recherches basées sur ce procédé et au moyen des microbes les plus variés. Les résultats seront publiés prochainement. La méthode est déjà employée couramment ici pour le diagnostic des colonies microbiennes que fournit l'eau de boisson.

RECHERCHES SUR LA TOXINE TÉTANIQUE

PAR LE D^r A. MARIE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les bactériologistes qui ont voulu chercher ce que devient la toxine tétanique dans l'organisme des animaux réceptifs sont loin d'être d'accord entre eux.

Tandis que Bruschetti¹ ne peut arriver à retrouver le poison dans le foie, Pestana² déclare que cet organe retient la toxine plus qu'à le poumon, la rate et les reins. Il ajoute qu'elle ne s'élimine pas d'une façon appréciable par les urines. Brunner³, au contraire, en injectant des urines ou de la salive d'un animal tétanique, provoque chez le cobaye des convulsions spécifiques.

Enfin Knorr⁴ étudie la présence du poison dans le sang.

D'autre part, Blumenthal⁵ prétend avoir observé des accidents tétaniques, sans incubation, chez des souris auxquelles il avait injecté des macérations d'organes morts du tétanos.

Cet auteur semblait avoir ainsi confirmé les assertions de MM. Courmont et Doyon sur la substance directement tétanisante, élaborée aux dépens de l'organisme par la toxine tétanique.

Il était donc intéressant de reprendre l'étude de ce sujet.

Il est d'abord un fait qui domine toute la question. Injectons sous la peau d'un lapin la dose minima de toxine lui donnant à coup sûr un tétanos mortel; si nous voulons obtenir le même résultat chez un second lapin de même poids, mais en l'inoculant

1. *Riforma medica*, 1890, octobre, n. 225.

2. *Semaine médicale*, 1891, 1^{er} juillet.

3. Experimentelle und klinische Studien über Tetanus p. 23. Conrad Brunner. Tübingen. 1894.

4. KNORR. Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit des Tetanus durch Tetanus Heilserum.

5. Weitere Beitrag zur Kenntniss des Tetanngiftes. *Zeitschrift für klinische Medicin*, 1897, p. 324.

directement dans la veine, il nous faudra employer une dose 7 ou 8 fois plus forte de la même toxine.

C'est que, dans le premier cas, la totalité de la toxine n'a pas été absorbée par les capillaires sanguins; une partie a suivi le trajet des filets nerveux et atteint directement la moelle épinière. Dans le deuxième cas, la toxine charriée par le torrent circulatoire a partiellement subi des transformations au contact des plasmas cellulaires.

L'expérience suivante prouve que le poison tétanique est susceptible de suivre la voie nerveuse.

On injecte dans le sciatique gauche d'un lapin 2 gouttes d'une solution, dans 1 c. c. d'eau, de 5 milligr. d'une toxine solide, qui tue une souris de 12 grammes à la dose de un millionième de milligramme. Pour cela, le nerf a été découvert sur une étendue de plusieurs centimètres, et isolé des téguments sous-jacents par un pont de papier Chardin. Après l'injection, l'endroit de la piqûre est collodionné et la plaie est recousue. 20 heures après l'inoculation, le lapin présente une légère roideur, et le surlendemain une paralysie avec contracture en extension de la patte opérée. Au 4^e jour le tétanos est généralisé et l'animal meurt.

On peut aussi faire l'expérience inverse : on résèque chez un lapin le 2^e nerf cervical le plus près possible de son émergence. Quand la plaie est complètement cicatrisée, on injecte, dans un des muscles de la patte paralysée, la dose minima de toxine qui donne le tétanos à un témoin de même poids. L'animal opéré ne prend pas la maladie.

Une fois introduite dans le sang, que devient la toxine tétanique? Expérimentons avec le sang, les organes, leurs sécrétions.

1^o Sang. — On retrouve la toxine tétanique dans le sang, pendant un temps variable après l'injection; cette durée est évidemment fonction de plusieurs conditions : quantité de toxine injectée, puissance de cette toxine, quantité de sang inoculé à la souris, enfin mode de l'injection au lapin.

Inoculons dans la veine de plusieurs lapins de 1,800 grammes 40 c. c. d'une toxine liquide, donnant à la souris un tétanos mortel à la dose de un cent-millième de c. c., puis prenons du sang dans la carotide à des époques de plus en plus éloignées de l'heure de

l'inoculation. Nous pourrions ainsi donner le tétanos à des souris en leur inoculant 1 c. c. de sang défibriné pris au lapin dans les 17 heures qui suivront son injection. Au delà de ce temps, on ne retrouve plus de traces de toxine, sensibles pour la souris, dans 1 c. c. de sang.

Inoculons au contraire 3 c. c. de la même toxine sous la peau d'un lapin de même poids. Plus de 25 heures après l'injection, le sang carotidien se montrera tétanique pour la souris à la dose de 1 c. c. C'est que, dans ce mode d'inoculation, le tissu cellulaire agit à la façon d'une éponge, distribuant au sang des capillaires très lentement et pendant longtemps la toxine qu'on lui a donnée. Knorr¹ a pu ainsi la retrouver dans le sang jusqu'à la mort.

Le poison tétanique inoculé directement dans le liquide sanguin en disparaît donc assez rapidement; les souris auxquelles on injecte le sang des lapins en expérience prennent un tétanos de plus en plus tardif et de moins en moins fort².

On injecte dans la veine d'un lapin de 1,780 grammes 10 mm. c. d'une toxine active au dix-millième de mm. c. pour la souris. Deux heures après, on inocule des souris avec des quantités variables de son sang défibriné. Or, seules deviennent tétaniques les souris qui ont reçu au moins $\frac{3}{4}$ de c. c. de sang, tandis qu'une formule, facile à déterminer, donnait un millième de c. c. comme quantité minima de sang devant tétaniser une souris, si le liquide sanguin avait conservé la quantité totale de la toxine injectée. Le poison tétanique existe donc dans le sérum sanguin.

2^e *Organes*. — Nous ne passerons pas en revue tous les résultats contradictoires des expérimentateurs qui ont recherché la toxine dans les organes des animaux tétaniques. Car, outre que ces auteurs n'indiquent pas l'activité du poison tétanique injecté, ils omettent un point important.

En effet, d'après ce que nous venons de voir, la toxine circule dans le sang plusieurs heures après l'injection. Il faut donc attendre que ce laps de temps soit écoulé avant de recher-

1. Knorr., *loc. cit.*

2. Contrairement à ce qu'on a dit généralement, la période d'incubation du tétanos est essentiellement variable et dépend, en particulier, de la quantité et de l'activité du poison tétanique. Un lapin, qui reçoit dans la veine $\frac{1}{2}$ mm. d'une toxine active au millionième, aura un tétanos généralisé au 4^e jour, tandis que 100 mm. de la même toxine donneront un tétanos, mortel en 12 heures.

cher la toxine dans les organes, sans quoi on la retrouvera dans tous et à coup sûr. La saignée de l'animal est insuffisante ; poussée aussi loin que possible, et suivie du lavage des organes, elle y laisse assez de sang pour que le poison tétanique puisse y être décelé. D'autre part, plus la dose de toxine injectée est considérable, ou, ce qui revient au même, plus la toxine est active, et plus longtemps elle sera décelable dans le sang. Aussi, dans toutes nos recherches, avons-nous saigné les lapins aussi complètement que possible, et inoculé des souris avec leur sang pour être bien certains que la toxine n'y était plus apparente.

L'organe était coupé en petits fragments et broyé avec du sable stérilisé dans un mortier, puis dilué dans la moindre quantité possible d'eau physiologique. On injectait ainsi à chaque souris jusqu'à 2 et 3 c. c. d'une véritable purée de cellules.

Dans ces conditions, même en injectant aux lapins des doses de toxine dix à vingt fois plus fortes qu'il n'était nécessaire pour les tétaniser, *jamais et dans aucun organe* nous n'avons retrouvé trace de toxine, et cela, aussi bien dans les organes enlevés avant l'apparition des symptômes que dans ceux qui étaient enlevés pendant l'acmé des accidents tétaniques. Pas une souris n'a présenté de symptômes se rattachant au tétanos. On constatait parfois un peu de roideur de la patte inoculée, mais elle disparaissait assez rapidement ; jamais de contractures généralisées ni de convulsions cloniques.

Voici quelques expériences :

Deux lapins de 2,400 gr. reçoivent chacun dans la veine auriculaire 10 c. c. d'une toxine active au dix-millième de c. c. ; 18 heures après l'injection, on saigne un des lapins ; son sang inoculé à des souris ne leur donne pas le tétanos. L'encéphale, la moelle épinière, les muscles de la cuisse, le rein, le foie sont broyés et injectés à des souris qui demeurent bien portantes par la suite. Le témoin a un tétanos généralisé 60 heures après l'inoculation, et meurt au 3^e jour.

Un lapin de 2,500 grammes reçoit dans la veine 20 c. c. d'une toxine active au dix-millième de c. c. A la 48^e heure, tétanos complet. On le saigne, et on injecte son sang, les testicules, la moelle épinière, l'encéphale à des souris. Elles ne présentent aucun symptôme tétanique.

On injecte dans la veine d'un lapin de 2,000 gr. 30 mm. d'une

toxine solide, active au millionième de milligramme, 20 heures après, trismus, roideur de la nuque, convulsions cloniques. On le saigne et on inocule de son sérum, les testicules et la rate à 3 souris : les poumons, le foie, la moelle épinière, l'encéphale à 4 petits cobayes.

Or la souris qui a reçu le sérum prend un tétanos très léger, ce qui montre qu'après 20 heures cette dose énorme de toxine (30 mm.) laisse encore des traces dans le sang. Des animaux injectés avec les organes, pas un ne présenta les jours suivants le moindre symptôme tétanique.

Un lapin de 2 kilogrammes reçoit dans la veine 50 milligrammes de la même toxine solide, 15 heures après, tétanos complet; on le saigne. Cerveau, moelle, foie sont injectés à 3 cobayes. La rate et 3 c. c. de son sérum sont inoculés à 2 souris. Or, 3 jours après on constate ceci : le cobaye qui a reçu le foie a une légère roideur des 2 pattes inoculées. La souris injectée avec la rate a un tétanos assez marqué, de même que la souris qui a reçu le sérum; cette dernière meurt même du tétanos. Les autres cobayes (moelle et cerveau), qui ont reçu la macération des organes les moins vasculaires, n'offrent au contraire aucun symptôme tétanique. On peut donc conclure que cette expérience, en apparence contradictoire aux précédentes, les confirme au contraire, puisque si le foie et la rate ont donné un tétanos passager, c'est que ces glandes très vasculaires renfermaient encore du sang malgré la saignée et le lavage.

De même, la moelle osseuse, les capsules surrénales, les ovaires, injectés avec les mêmes précautions, n'ont jamais provoqué aucun symptôme tétanique.

Nous n'avons pas davantage retrouvé la toxine dans la sécrétion des organes.

Un lapin de 2,400 grammes reçoit dans la veine 7 c. c. d'une toxine active au cent-millième de c. c. Les excréments sont recueillis à partir de ce moment. 48 heures après, tétanos du train postérieur. On vide de son contenu l'utérus, dont on racle la muqueuse; le produit est délayé dans l'eau, filtré au papier puis à la bougie. Les 20 c. c. qu'on recueille sont injectés sous la patte d'un cobaye de 500 grammes, qui ne présenta aucun symptôme de tétanos.

On sonde la vessie d'un lapin téтанisé par 8 milligrammes d'une toxine, active au millionième de milligramme, et on injecte 10 c. c. de ses urines sous la peau des deux pattes postérieures d'un cobaye de petite taille. Rien de particulier. 20 milligrammes d'urine provenant d'un lapin inoculé avec 50 milligrammes de la même toxine sont injectées sous la peau d'un cobaye. Il reste en bonne santé.

Donc, nous ne sommes jamais parvenus à retrouver la toxine dans les tissus des organes ni dans leurs sécrétions. Le sang la charrie au contact des plasmas cellulaires, lesquels contractent des combinaisons avec elle et le transforment ainsi.

On sait que MM. Courmont et Doyon¹ prétendent avoir surpris la nature de ces combinaisons en injectant à des grenouilles des muscles, de l'urine d'animaux téaniques, en transfusant du sang de chien téanique dans les veines d'un chien normal. Les animaux ainsi opérés manifestaient *immédiatement, et sans période d'incubation*, les symptômes d'un téanos qui se généralisait quelquefois.

Ces auteurs édifièrent sur ces expériences une théorie du téanos : le ferment, sécrété par le bacille du Nicolaïer, ne serait pas toxique par lui-même, mais il élaborerait, aux dépens des cellules de l'organisme, une substance directement téanisante, comparable par ses effets à la strychnine.

Pour ce qui est des urines, nous avons dit plus haut qu'injectées à des cobayes, animaux plus sensibles que la grenouille au poison téanique, les urines, recueillies chez un lapin en plein téanos, ne provoquèrent jamais de symptômes téaniques, ni immédiats, ni ultérieurs².

D'autre part, 20 c. c. de sang pris sur un chien atteint de convulsions téaniques, sont inoculés à un petit cobaye ; aucun des troubles subits, signalés par M. Courmont, ne se manifeste, et cependant il s'agit d'un animal incomparablement plus apte que le chien à prendre le téanos. Ce résultat était à prévoir, car maintes fois il nous est arrivé d'injecter à des souris du sang de lapin en plein téanos sans observer rien de semblable à ce que décrit cet auteur : hyperexcitabilité, roideur intermittente des

1. *Annales de la Société de Biol.*, 1893, p. 294, 617 et 714.

2. M. Jacob, dans un article récent, déclare n'avoir jamais retrouvé la toxine téanique dans les urines du malade. (*Deut. Med. Woch.*, 1897, 17 juin.)

membres, secousses musculaires, accidents disparaissant après quelques heures, et d'ailleurs insuffisants pour qu'on soit autorisé à y reconnaître des manifestations tétaniques.

Enfin nous avons tenu à répéter l'expérience de M. Courmont et Doyon relative aux extraits secs du tissu musculaire tétanisé.

Or, toujours nous avons obtenu les mêmes résultats avec des muscles d'animal non tétanique; dans les deux cas les grenouilles ou les souris sont pareillement prises de phénomènes de paralysie, sans contracture nette, avec ou sans coma, sans qu'il s'agisse absolument en rien de phénomènes tétaniques.

Dans leurs notes sur le tétanos sans incubation, MM. Courmont et Doyon citent, comme preuve à l'appui de leur théorie, ce fait que la grenouille est réfractaire en hiver aux produits du bacille de Nicolaïer, tandis qu'aux températures de l'été (28 et 30°) l'animal devient tétanique après une incubation de six à huit jours. Il faut remarquer combien ce fait est difficile à expliquer, si on admet une action directe du ferment soluble sur la fibre nerveuse, comme origine de la contracture.

La substance directement tétanisante « exige pour se former des conditions favorables de température. Ainsi s'explique l'immunité de la grenouille en hiver vis-à-vis du ferment bacillaire ».

Or cette immunité passagère de la grenouille, généralement admise, n'est pas un fait exact.

Il est inutile de soumettre la grenouille à une température supérieure à 30° (Courmont et Doyon, Babès ¹) pour leur donner le tétanos, après injection ou de toxine ou de bacilles de Nicolaïer. Durant tout l'hiver qui vient de s'écouler, nous avons pu tétaniser des grenouilles sans élever la température de leur eau, laquelle ne cesse d'osciller entre 13 et 18 centigrades.

Les grenouilles qui prennent le plus facilement la maladie sont les grises (*Rana temporaria*); cependant, en augmentant la dose de la toxine, on parvient à donner le tétanos aux vertes (*Rana esculenta*). Chez les premières il suffit d'injecter un demi-milligramme d'une toxine active au cent-millième et même au dix-millième pour provoquer un tétanos typique.

Il débute après une période d'incubation très variable, suivant la dose et la température ambiante : avec 1/2 mg., les premiers signes apparaissent entre le 18^e et le 25^e jour pour une

1. Annales de l'Institut de Bact. de Bucarest. Vol. V, p. 348.

température voisine de 15°, tandis que 6 milligrammes donnent le tétanos au bout de 9 à 15 jours. La maladie évolue en un temps toujours long (10 à 15 jours) en présentant les symptômes bien connus.

Blumenthal, dans ces derniers temps, est revenu sur le tétanos sans incubation; mais il procède d'une toute autre façon que MM. Courmont et Doyon.

Il divise un petit fragment des organes des malades morts du tétanos; des morceaux de moelle épinière, par exemple, sont triturés, puis dilués dans 25 c. c d'eau chloroformée, additionnée de 0^{gr}, 01 de NaCl et de 2 gouttes d'une solution à 10 0/0 de carbonate de soude.

On ajoute encore 1 c. c de chloroforme au mélange, qui est mis à l'étuve à 39° pendant 24 heures, après quoi on filtre à travers un linge fin.

En inoculant à des souris le produit de la filtration de moelle, foie, utérus, traités de la sorte, Blumenthal provoque *instantanément et sans période d'incubation* des symptômes qu'il rattache au tétanos, et consistant en légère exagération des réflexes, paraplégie, convulsions cloniques, grande fréquence des mouvements respiratoires. La mort survient rapidement en 24, 17 heures ou même quelques minutes. D'autres fois les symptômes ne se manifestent qu'au 3^e jour. L'auteur en conclut que la substance qui donne le tétanos sans incubation ne se laisse pas facilement extraire des cellules, et que plus fréquents sont les cas où existe une période latente.

Nous avons essayé de reproduire les expériences de Blumenthal : mais les troubles produits ne sont rien moins que tétaniques : de plus, on obtient identiquement les mêmes symptômes en traitant par le procédé indiqué des organes normaux. N'ayant pas à notre disposition de viscères de malades morts du tétanos, nous avons expérimenté sur des animaux de laboratoire.

La moelle épinière, les testicules, la rate, le foie et les reins d'un lapin, rendu tétanique par 5 milligrammes d'une toxine active au millionième de mg., sont traités par le procédé décrit ci-dessus : de même façon sont traités les organes d'un lapin normal, et les produits filtrés des uns et des autres sont injectés à deux séries de souris.

Presque aussitôt l'injection faite, on note chez les souris des deux séries des symptômes identiques : difficulté de la marche, paralysie des deux pattes postérieures, accélération des mouvements respiratoires; en pinçant la patte ou la queue, on détermine des secousses convulsives : contraction passagères en extension d'une ou des deux pattes de derrière. Les souris meurent à des époques variables, le lendemain ou après 48 heures.

Il s'agit, dans ces expériences, de troubles produits par des agents de décomposition cellulaire qui se forment dans les tissus exposés à l'étuve après la mort, et nullement de tétanos vrai.

CONCLUSIONS.

1° La toxine tétanique, injectée aux animaux, demeure un temps variable dans leur sang ;

2° Ce temps écoulé, l'inoculation des organes et des sécrétions glandulaires ne provoque aucun trouble, ni tétanique, ni autre; la toxine ne s'y retrouve pas, au moins avec ses propriétés tétanisantes connues ;

3° Les extraits des organes des animaux tétaniques, préparés soit¹ par le procédé de MM. Courmont et Doyon, soit par celui de M. Blumenthal, provoquent, quand on l'inocule, des troubles immédiats qui n'ont rien à voir avec les symptômes ordinaires du tétanos ;

4° On n'est plus en droit d'invoquer, à l'appui de la théorie de l'école de Lyon, l'immunité transitoire de la grenouille, qui peut en effet contracter le tétanos dans les mêmes conditions de température extérieure que d'autres animaux de laboratoire.

COMBUSTION BIOLOGIQUE DU PROPYLGLYCOL

PAR M. A. PÉRÉ

Pharmacien-major de 1^{re} classe.

(Travail du laboratoire de chimie biologique de la Sorbonne, à l'Institut Pasteur.)

Dans un précédent mémoire¹, j'ai montré que les sucres représentent le premier terme de la combustion des alcools polyatomiques naturels, par certains microbes aérobies. Avant d'aboutir aux corps brûlés, la mannite est d'abord transformée en des hexoses douées du pouvoir rotatoire, et la glycérine en une triose lévogyre.

Sur ces données, j'avais émis l'hypothèse que les alcools polyatomiques autrement constitués que les alcools naturels, tel le propylglycol dont la molécule renferme un seul groupement alcoolique primaire, pourraient aussi engendrer des corps aldéhydiques optiquement actifs, et qui, construits sur le même squelette que l'alcool générateur, différeraient par leur constitution chimique des aldoses naturelles.

Comme il est facile de s'en rendre compte, le point de vue auquel je me suis placé dans cette étude du propylglycol diffère essentiellement de celui qui suscita les belles recherches de M. Le Bel. L'objectif visé par ce savant était d'appuyer d'une preuve nouvelle sa théorie du carbone asymétrique, et par conséquent de démontrer que le propylglycol, par cela même que sa molécule est dissymétrique, est susceptible de revêtir plusieurs formes stéréo-isomériques capables d'agir sur le plan de polarisation. Il ensemença donc divers microorganismes, moisissures et bactéries, dans des solutions de sels ammoniacaux additionnées de propylglycol : après plusieurs mois, il retira des liquides de culture du propylglycol qui faisait tourner vers la

1. Ces *Annales*, août 1896.

gauche le plan de polarisation. La preuve était faite : l'inactivité optique du propylglycol se montrait liée à la constitution *racémique* de sa molécule. Le propylglycol est un corps *compensé*.

Pour nous il importe peu, au fond, que le résidu de propylglycol non brûlé possède ou ne possède pas le pouvoir rotatoire ; et si nous avons à nous arrêter sur ce point, ce sera uniquement pour y chercher des indices et des arguments à l'aide desquels nous chercherons à remonter vers l'origine des faits : mais le point capital est de suivre dans son mouvement de combustion le propylglycol qui disparaît, et d'observer si la formation d'un corps aldéhydique optiquement actif et correspondant au propylglycol ne marquerait pas le premier stade de cette combustion.

Réduit à ces limites, le problème est assez simple ; par le fait, j'ai retrouvé dans les liquides de culture une aldéhyde dextrogyre, qui par hydrogénation régénère le propylglycol. Mais il se complique un peu si nous essayons de l'élargir par la recherche de la signification biologique des résultats obtenus.

Il faut considérer en effet que le propylglycol, qui est inactif, ne saurait aboutir par oxydation chimique à des aldéhydes douées du pouvoir rotatoire. Aussi la découverte de cette aldéhyde dextrogyre, que j'appellerai *Propylaldol*, par oxydation biologique, pose-t-elle devant nous les questions suivantes : Comment retrouvons-nous une aldéhyde dextrogyre là où les oxydants chimiques ne produiraient que des corps inactifs ? Pourquoi ce propylaldol n'est-il pas *compensé* au même titre que le propylglycol générateur ? Par quel mécanisme a-t-il pris naissance ?

Peut-être la solution de ces questions jetterait-elle quelque lumière sur les phénomènes intimes de la vie cellulaire.

I

M. Le Bel cultiva ses microorganismes dans des solutions de sels ammoniacaux additionnées de propylglycol purifié. Je n'ai malheureusement pu réussir à obtenir des cultures dans de telles conditions, avec les bactéries dont je parlais dans mon dernier mémoire, *Tyrophthrix tenuis*, *Bacillus subtilis* et *Bac. mesentericus vulgaris*, soit que ces microbes ne puissent attaquer le propylglycol lorsque celui-ci représente la source unique

de carbone dans le liquide de culture, soit que le propylglycol mis à l'épreuve ne fût pas suffisamment purifié ou que le mélange de sels employé ne fût pas des plus favorables au développement des bactéries. Mais il est facile de constater l'attaque du propylglycol lorsqu'on vient à substituer le bouillon de viande à la solution de sels ammoniacaux.

Si nous ensemençons le *Tyrophrix tenuis* dans du bouillon renfermant 4 à 5 0/0 de propylglycol, il se forme bientôt, à la température de 35°, un voile épais qui surnage le liquide limpide. Après 10 jours ou 15 jours d'incubation, ces liquides, préalablement additionnés d'acide citrique, fournissent par distillation une liqueur fortement réductrice. Versons 1 c. c. de cette liqueur dans un tube renfermant 1 c. c. de solution cupro-sodique, nous verrons se former immédiatement, même à froid, au niveau de séparation des deux liquides, un anneau jaune d'où se détachent des particules d'oxyde de cuivre qui se déposent, et la réduction se poursuit jusqu'à complète décoloration. Avec la liqueur de Fehling étendue de 3 ou 4 parties d'eau, le trouble n'apparaît, à froid, qu'après quelques minutes, et la réduction complète s'effectue en 2 ou 3 heures.

La solution ammoniacale de nitrate d'argent est réduite à chaud, ainsi que les solutions alcalines d'iodure mercurique, à froid.

Toutes ces réactions témoignent de la formation, aux dépens du propylglycol, d'un corps aldéhydique puissamment réducteur; mais de même que les solutions de glycérose et des autres aldoses, celles de cette aldéhyde ne colorent pas les solutions acides de fuchsine décolorées par l'acide sulfureux.

Afin de séparer cette aldéhyde du propylglycol qui peut rester dans les liquides de culture, je distillais lentement ceux-ci à 100° dans un appareil muni du tube déflegmateur de Le Bel, et pour 100 c. c., je recevais seulement 20 c. c. de produit. Dans ces conditions, le propylglycol reste en entier dans l'appareil, tandis que le produit recueilli est riche en aldéhyde. Ce produit est toujours *dextrogyre*. Dans les diverses observations que j'ai faites, l'angle de déviation variait de + 6' à + 10', au tube de 2 décimètres.

Ayant réuni 100 c. c. de liquide provenant de la distillation,

1. Une partie de viande de bœuf, pour 2 p. d'eau.

dans les conditions ci-dessus mentionnées, du contenu de 5 ballons renfermant chacun 100 c. c. de liquide de culture à 50/0 de propylglycol, chacun de ces ballons ayant fourni 20 c. c. de produit, j'ai traité cette solution réductrice et dextrogyre, $\alpha = +8'$, par l'amalgame de sodium à 20/0, en conservant au mélange une réaction légèrement alcaline.

Lorsque tout pouvoir réducteur a disparu, le liquide est neutralisé par l'acide chlorhydrique, puis distillé au tube débilemateur : les premières parties du produit distillé renferment en petite quantité de l'alcool isopropylique reconnu à la plupart de ses caractères, probablement mêlé de traces d'alcool allylique.

Le résidu de la distillation, soit environ 20 c. c., est complètement évaporé sous le dessiccateur, et ce nouveau résidu traité par l'alcool anhydre. La solution alcoolique laisse par évaporation spontanée 0^{gr},47 d'un liquide sirupeux présentant les caractères du propylglycol et dont la solution est dextrogyre : $\alpha = +14'$ au tube de 2 décimètres.

Comme on le voit, notre corps aldéhydique correspond au propylglycol ; sa constitution chimique et sa structure moléculaire en font un intermédiaire entre cet alcool et l'un des acides éthylidénolactiques actifs. De plus nous pouvons le rapprocher avec intérêt de l'acétylcarbinol de M. Perkin, lequel représenterait sa cétose ; les deux isomères présenteraient ainsi les relations de la glycérose aldéhydique avec la dioxyacétone, ou du dextrose avec le lévulose.



Enfin, ce propylaldol peut être considéré comme l'homologue inférieur de l'aldol de Wurtz, lequel correspond au butylglycol et renferme aussi un atome de carbone asymétrique.

II

Nous nous expliquons facilement la formation des aldoses optiquement actives par combustion biologique des alcools polyatomiques eux-mêmes doués du pouvoir rotatoire, tels que

la mannite, attendu que les oxydations chimiques produiraient les mêmes effets. Nous comprenons aussi la formation du propylglycol gauche par combustion biologique du propylglycol racémique, en vertu de la propriété que possède le protoplasma cellulaire, qui est dissymétrique, d'établir un choix entre deux stéréo-isomères. Mais, dans le cas qui nous occupe, le mécanisme de la formation du propylglycol droit par combustion biologique du propylglycol compensé ne se présente pas à l'esprit avec la même précision.

Les conjectures que nous pourrions faire, *a priori*, sur les actions mises en œuvre, tendraient à faire intervenir à la fois une réaction d'oxydation et un phénomène d'élection : ou bien le propylglycol serait préalablement dédoublé, comme dans l'expérience de M. Le Bel, et celui des deux isomères actifs qui subirait la combustion donnerait à titre intérimaire l'aldéhyde qui lui correspond ; ou bien, le propylglycol serait brûlé également par les deux côtés de sa molécule, pour engendrer un propylaldol compensé qui se dédoublerait dans le protoplasma cellulaire, l'aldéhyde lévogyre étant brûlée plus facilement que son isomère droit : c'est-à-dire que l'oxydation serait accompagnée ou du dédoublement de l'alcool générateur, ou du dédoublement de l'aldéhyde formée.

Nous voici donc conduits à rechercher si le propylglycol est dédoublé, comme dans l'expérience de M. Le Bel.

J'ensemence le *Tyrophrix tenuis* tiré d'une culture sur du bouillon de viande âgée de huit jours dans le liquide stérilisé suivant :

Bouillon de viande neutre.....	200 c. c.
Propylglycol.....	8 gr.

Après 30 jours d'incubation à 35°, le liquide est concentré à 100 c. c. par distillation au déflegmateur, puis chauffé un instant avec un excès de chaux dans le but de détruire l'aldéhyde qui reste. Le mélange est évaporé à sec sous le dessiccateur, le résidu est repris par 20 c. c. d'alcool absolu, et ce liquide additionné de 20 c. c. d'éther. Après 24 heures de repos, j'ai filtré, doucement évaporé pour chasser l'éther, puis chauffé dans un courant d'air à 50°, et enfin desséché sur l'acide sulfurique. Il reste du propylglycol qui donne au polarimètre :

$$P = 4^{\text{gr}}.30, \alpha = + 4^{\circ} 4', l = 2 \text{ déc.}, V = 20 \text{ c. c.}$$

$$[\alpha]_{\text{D}} = + 2^{\circ} 29'$$

A l'inverse de ce qui s'est passé dans l'expérience de M. Le Bel, c'est le propylglycol gauche qui est brûlé, et son isomère dextrogyre se retrouve dans le liquide de culture.

Ce résultat est extrêmement intéressant au point de vue chimique: il nous fait connaître avec certitude la 2^e forme active du propylglycol, et ainsi sont connus les trois isomères prévus par la théorie; au point de vue biologique, il soulève la question de savoir si le choix différent établi entre les deux isomères, d'un côté par les microbes de M. Le Bel, et d'un autre côté par le *Tyrophrix tenuis*, exprimerait une propriété spécifique de ces microbes, où s'il tiendrait plutôt à la différence dans la qualité de l'azote alimentaire, M. Le Bel ayant donné de l'azote minéral à ses microbes, tandis que le *Tyrophrix tenuis* vivait d'azote organique.

C'est donc le propylglycol lévogyre qui subit la combustion, d'où il semble que le propylaldol droit est issu de ce propylglycol.

Mais il importe de nous arrêter ici un instant pour remarquer combien curieux serait un tel processus. Comme je l'ai indiqué un peu plus haut, le propylaldol droit régénère le propylglycol droit par hydrogénation, et par conséquent lui correspond; il en découle nécessairement que la formation du propylaldol droit retrouvé dans les liquides de culture aux dépens du propylglycol gauche, qui a disparu de ces liquides, impliquerait, en outre d'une oxydation, une transposition des radicaux monovalents H et OH autour du carbone asymétrique.

Une telle interprétation n'est pas de celles qui s'imposent sans l'appui de documents décisifs; et comme documents de cet ordre nous voyons uniquement, dans ce cas particulier, à faire la preuve que, seul, le propylglycol gauche entre en réaction.

Il est possible, en effet, que le choix entre les deux propylglycols isomériques soit moins absolu que semble le montrer l'expérience précédente; il n'est pas contraire à la vraisemblance ni aux précédents que les deux isomères entrent tous les deux en combustion, mais avec une vitesse inégale.

C'est ce que j'ai cherché à vérifier dans l'épreuve qui suit:
J'ensemence dans cinq ballons, contenant chacun 100 c. c.

de bouillon et 5 gr. de propylglycol purifié, le *Tyrothrix tenuis* tiré d'une culture sur le même liquide âgée de huit jours : les cinq ballons étaient tenus à l'étuve à 35°, et je dosais par intervalles le propylglycol qui restait dans ces ballons, à l'aide du procédé décrit plus haut.

1° Après 20 jours d'étuve :

Propylglycol restant : 2,15; consommé 57 0/0
 $p = 2^{\text{gr}}.15$; $\alpha = + 44'$; $V = 20$ c. c., $l = 20$ déc.; $[\alpha]_D = + 3^{\circ} 24'$

2° Après 30 jours :

Propylglycol restant : 1,855; consommé 62,90 0/0
 $p = 1,855$, $\alpha = + 48'$, $V = 20$ c. c., $l = 2$ déc.; $[\alpha]_D = + 4^{\circ} 18'$

3° Après 40 jours :

Propylglycol restant : 1,705; consommé 65,90 0/0
 $p = 1,705$, $\alpha = + 48'$, $V = 20$ c. c., $l = 2$ déc.; $[\alpha]_D = + 4^{\circ} 41'$

4° Après 60 jours :

Propylglycol restant : 1,446; consommé 71,08 0/0
 $p = 1,446$, $\alpha = + 45'$, $V = 20$ c. c., $l = 2$ déc.; $[\alpha]_D = + 5^{\circ} 6'$

A partir de ce moment, le liquide de culture brunit et prend une réaction ammoniacale très marquée; puis, après quelques jours, la membrane de microbes se flétrit, se déchire et tombe au fond du vase.

5° Après 80 jours d'étuve :

Propylglycol restant : 1,420; consommé 71,60 0/0
 $p = 1,420$, $\alpha = + 44'$, $V = 20$ c. c., $l = 2$ déc.; $[\alpha]_D = + 5^{\circ} 9'$

Cherchons à présent la signification de ces données. Nous constatons, après 20 jours de culture, que plus de 50 0/0 du propylglycol a disparu, c'est-à-dire que déjà l'alcool dextrogyre est entré en réaction en même temps que son isomère. Nous constatons ensuite que le pouvoir rotatoire du propylglycol restant s'élève dans chacune des expériences à mesure que diminue sa quantité, c'est-à-dire qu'il reste encore du propylglycol lévogyre. Enfin le pouvoir rotatoire devient fixe, ainsi que la quantité de propylglycol, le microbe ayant alors porté exclusivement son action sur les éléments nutritifs du bouillon de viande.

Et voici comment tous ces faits peuvent se traduire : du commencement à la fin de l'expérience, les deux isomères participent concurremment au mouvement de combustion, le glycol lévogyre plus rapidement que le glycol dextrogyre; mais l'attaque de ce dernier cesse lorsque le premier a complètement ou presque complètement disparu, comme si le propylglycol droit était par lui-même incapable d'entrer en réaction et s'y trouvait purement entraîné par l'attaque de son isomère gauche. Il s'ensuit qu'il doit se former à chaque instant et en proportions différentes deux propylaldols isomériques, correspondant aux deux propylglycols générateurs, aldéhydes elles-mêmes atteintes par la combustion intracellulaire, l'isomère gauche étant plus rapidement brûlé que le droit, que nous retrouvons dans le liquide de culture.

Nous saisissons dès lors le mécanisme de la formation du propylaldol droit en partant du propylglycol racémique : aucune action n'intervient que nous n'ayons déjà vue à l'œuvre, puisque tout se résume en deux combustions électives portant, la première sur le mélange des deux alcools isomériques, la deuxième sur le mélange des deux aldéhydes isomériques qui procèdent de ces alcools.

Il n'est pas sans intérêt de remarquer que l'arrêt subit dans l'attaque du propylglycol, au moment où son pouvoir rotatoire est égal à 5° , permet de regarder ce chiffre comme représentant avec une certaine approximation le pouvoir rotatoire moléculaire du propylglycol actif. Pour confirmer dans une certaine mesure ce qui a trait dans ces expériences à la détermination du pouvoir rotatoire, j'ai repris le mélange des résidus de propylglycol restant dans les cultures aux diverses époques, et j'en ai retiré le propylglycol pur dont j'ai pesé un poids déterminé :

$$p = 8\text{gr. } \alpha = + 3^{\circ}, V = 20 \text{ c. c. ; } [\alpha]_D = + 3^{\circ} 45'$$

L'on pourrait demander si l'aldéhyde droite se trouve dans les liquides de culture à l'état de pureté, c'est-à-dire sans aucun mélange avec son isomère. La question est délicate; cependant le pouvoir rotatoire du propylglycol obtenu par hydrogénation de ce propylaldol pourra peut-être nous fournir un renseignement.

$$p = 0,47. \alpha = + 14', V = 20 \text{ c. c., } l = 2 \text{ déc. ; } [\alpha]_D = + 4^{\circ} 58'$$

Ce pouvoir rotatoire se rapproche sensiblement, comme on le voit, du pouvoir rotatoire maximum de nos résidus de propylglycol : il semble donc qu'il ne reste pas sensiblement de propylaldol gauche, mélangé au propylaldol droit.

En résumé, l'étude biologique du *Tyrothrix tenuis* nous a mis sur la voie de quelques faits intéressants. Outre qu'elle nous a fait connaître le propylglycol et le propylaldol sous leur forme dextrogyre, elle nous a permis aussi de mettre en lumière un processus curieux mis en œuvre par les êtres vivants pour aboutir aux corps optiquement actifs en partant des corps compensés. Remarquons que par un côté la cellule s'est ici comportée à la manière des agents chimiques, oxydant les deux alcools isomériques et formant deux aldéhydes isomériques. Là où apparaît le caractère spécifique de l'être vivant, c'est dans le choix relatif que le protoplasma dissymétrique a établi entre les deux isomères alcooliques ou aldéhydiques.

Peut-être trouverai-je là un repère pour poursuivre l'étude du mécanisme de la combustion biologique des corps ternaires, ébauchée dans un premier mémoire, et en particulier l'étude des procédés employés par ces microbes pour former une glycérosee lévogyre en partant de la glycérine symétrique.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.